



PC/IB04/02621

REC'D 13 SEP 2004

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 18 AOUT 2004

BEST AVAILABLE COPY

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

### PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

ter depot

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

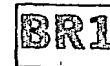
Modifiée le 26/03/04



N° 11354\*03

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 030103

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

9 DEC 2003

75 INPI PARIS 34 SP

N° D'ENREGISTREMENT

0314389

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

09 DEC. 2003

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 241054 D21824 NT

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU

20, rue de Chazelles

75847 PARIS CEDEX 17

FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

#### 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de  
brevet européen Demande de brevet initiale

☐

N°

Date

#### 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

CULTURE DE CELLULES AVIAIRES EN MILIEU ASERIQUE

BEST AVAILABLE COPY

#### 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation EUROPE

Date 22 07 2003

N°

03291813.8

Pays ou organisation PCT

Date 07 03 2003

N°

03/076601

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

#### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

VIVALIS

Prénoms

Forme juridique

SOCIETE ANONYME A DIRECTOIRE ET CONSEIL DE

SURVEILLANCE

Code APE-NAF

422497560

Domicile  
ou  
siège

Rue

Lieudit la Corbière, 49450 ROUSSAY

Code postal et ville

Pays

Nationalité

FRANCE

N° de téléphone (facultatif)

Française

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*04

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DR 540 © W / 191203

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 241054 D21824 NT

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉECabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen Demande de brevet initiale

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROCEDE DE CULTURE DE CELLULES AVIAIRES EN MILIEU ASERIQUE

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation EUROPE

Date 22 07 2003

N° 03291813.8

Pays ou organisation PCT

Date 07 03 2003

N° FR/03/00735

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

VIVALIS

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

SOCIÉTÉ ANONYME A DIRECTOIRE ET CONSEIL DE  
SURVEILLANCE

422497560

Domicile

ou

siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Lieu dit la Corbière, 49450 ROUSSAY FRANCE

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

**9 DEC 2003**

LIEU

**75 INPI PARIS 34 SP**

N° D'ENREGISTREMENT

**0314389**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 030103

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		<b>241054 NI</b>	
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles	
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17	
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00	
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99	
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	

reçue le 26/03/04



**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

page 2/2

BR2

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

**BEST AVAILABLE COPY**

DB 540 W / 191203

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		241054 D21824 NT
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
Nationalité		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>

*[Signature]*  
92-1053

La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de cellules aviaires, de préférence des cellules souches aviaires, capables de croître en milieu asérique ainsi que sur les cultures de cellules souches ou primaires aviaires en milieu asérique. L'invention concerne également l'utilisation de ces cultures pour la  
 5 fabrication de vaccins, notamment de vaccin contre la variole et la grippe, ainsi que la production d'anticorps et de protéines recombinantes.

Depuis plusieurs décennies, différents types cellulaires d'origine variée sont utilisés pour la production de vaccins et de molécules recombinantes d'intérêt  
 10 thérapeutique telles les protéines et notamment les anticorps. Ces cellules sont d'origine humaine, simienne, canine, bovine ou aviaire. Au cours de leur culture ces cellules ont en général subi des modifications dans leur génome, les transformant et leur conférant des propriétés spécifiques telles l'immortalité. Les infections virales et les mutations spontanées dans des loci clés pour le contrôle du cycle cellulaire font  
 15 parti des événements d'immortalisation les plus connus. A titre d'exemple, on trouve, parmi les lignées les plus utilisées, les CHO (Chinese Hamster Ovary), HEK 293 (Human Embryonic Kidney), Vero (Vervet Origin), MDCK (Madin-Darby canin kidney), BHK21 ( Baby Syrian Hamster Kidney), Hela (dérivées d'un carcinome cervival), COS7 (Monkey Kidney), HEP2 (human epithelial like larynx carcinoma  
 20 cells), MDBK (Bovine Kidney) et MRC5 (Foetal lung fibroblast), QT (cellules de caille). Les cellules primaires aviaires de type fibroblastique (CEF pour *chicken embryonic fibroblasts*) sont plus généralement employées pour la production de vaccins tels celui contre la grippe.

Ces différentes cellules utiles à la production des vaccins et des molécules  
 25 thérapeutiques sont susceptibles d'exposer indirectement le futur patient à différents risques biologiques dus aux conditions de cultures *in vitro*. En effet, ces cellules sont, en général, maintenues dans des milieux de cultures classiques disponibles commercialement nécessitant une complémentation en sérum animal, tel que le sérum de veau foetal, adulte ou nouveau-né. Ils peuvent en outre contenir des  
 30 lyophilysats ou hydrolysats d'origine animal, végétal ou autre.

Le sérum est une excellente source de nutriments pour la cellule. Il apporte des sels minéraux, des vitamines, des facteurs de protection et de croissance, des hormones, et différents métabolites tels que le cholestérol, l'albumine, la transferrine, des facteurs d'attachements. Néanmoins, il présente de nombreux désavantages ou  
5 inconvénients dans son utilisation. Plus particulièrement pour les sociétés pharmaceutiques :

- son prix est élevé,
- la variabilité entre les lots liés à la variabilité biologique des animaux  
10 donneurs est importante,
- c'est un mélange non défini chimiquement,
- la présence de protéines d'origine animale en production de protéines recombinantes rend le processus de purification plus complexe,
- les risques de transmission d'agents pathogènes comme les bactéries, les champignons, les virus et le prion (BSE) ne sont pas négligeables.

15 A la suite de la découverte dans les années 1980, de l'implication du prion dans l'étiologie de la maladie de l'encéphalite spongiforme bovine (BSE), les autorités sanitaires ont réagi et publié des procédures et des recommandations très strictes face à l'utilisation de milieu de culture cellulaire contenant des composants d'origine animale, tels le sérum ou certains hydrolysats protéiques, dans les  
20 différentes productions vaccinales et de molécules recombinantes. La traçabilité des produits utilisés (origine, mode de production, certificats d'analyse) est devenue un impératif incontournable. Les contraintes liées aux cultures et à la production de vaccins et de molécules à visée thérapeutique ont ainsi augmenté pour les sociétés pharmaceutiques. Actuellement les autorités sanitaires exercent une pression forte  
25 pour aller vers une amélioration des conditions de culture pendant l'établissement des lignées cellulaires et leur amplification. La tendance est l'élimination totale de tout produit d'origine animale ou de produits dérivés dans les milieux.

Ainsi, les milieux cellulaires ne contenant pas d'éléments d'origine animale sont privilégiés. Par ailleurs, les sera utilisés proviennent de pays ne connaissant de  
30 préférence aucun cas de BSE (USA, Australie, Nouvelle Zélande et jusqu'à tout récemment le Canada). Le sérum est testé avant toute utilisation pour détecter la

présence d'éventuels pathogènes connus et répertoriés (bactéries, champignons, mollicutes et virus...). Pour prévenir les éventuelles contaminations virales avant utilisation, les sera sont en outre irradiés à des doses massives (plusieurs dizaines de Kilo Grey).

5 Dans ce sens, les fabricants de milieux de culture développent des milieux de culture optimisés pour un type cellulaire (par exemple HEK 293, CHO, Vero, MDCK) qui ne nécessitent pas de complémentation en sérum. Ces milieux sont dits asériques. Or, la grande majorité des lignées cellulaires ne sont pas aptes à être cultivées en absence de sérum sur des milieux asériques. Le passage d'une culture  
10 sur milieu classique supplémenté en sérum à un milieu asérique est délicat et demande un travail d'adaptation et de sélection qui n'est pas évident.

L'utilisation de ces milieux asériques provoque différents stress pour les cellules en culture. Ainsi, les cellules subissent un stress lié à l'adaptation ou habitude aux nouvelles conditions de culture. Cette phase d'adaptation entraîne en  
15 général beaucoup de mortalité et une sélection importante de la population. Egalement, les cellules en culture subissent un stress physique provoqué par l'agitation des cultures, conséquence des forces de cisaillement beaucoup plus importantes dans les milieux asériques qui contiennent peu ou pas de BSA (sérum albumine bovine) ; cette protéine est en effet connue pour solidifier la membrane et  
20 ainsi protéger les cellules des forces de cisaillements permettant de faciliter l'agitation cellulaire et le transport. En général, la BSA peut être remplacée par un substitut tel l'acide pluronique F68 ou le polyéthylène glycol. Par ailleurs pour les cellules adhérentes, un problème d'attachement au support est à souligner, les facteurs d'attachement étant apportés en général par le sérum dans les milieux  
25 classiques de culture.

Or, à notre connaissance, aucune lignée cellulaire aviaire n'a été maintenue ni amplifiée en culture sur de tels milieux asériques. Le problème que se propose de résoudre la présente invention est de développer des modèles de cellules souches aviaires capables de proliférer sur du long terme, en suspension ou adhérentes, sans  
30 l'apport de cellules nourricières (*feeder cells*), de facteurs de croissance et/ou de sérum, dans un milieu de culture asérique. La présente invention fournit donc un



procédé d'adaptation des cellules souches aviaires aux milieux asériques. Plus précisément, l'invention propose une méthode permettant d'adapter de façon directe les cellules souches aviaires à des milieux asériques, d'effectuer une adaptation sur plusieurs passages pour de nombreux milieux asériques, ou d'effectuer cette  
5 adaptation à un stade précoce sur des cellules souches aviaires encore dépendante de la couche nourricière (*feeder*). L'inventeur a en outre démontré qu'il est possible de maintenir les cellules souches aviaires en culture sur du long terme dans un milieu asérique, et d'effectuer des cycles de congélation-décongélation de cellules dans ces milieux asériques.

10 La présente invention concerne également des lignées de cellules souches aviaires, des lignées de cellules primaires aviaires, des lignées aviaires différenciées ou non capables de croître pendant de longue période de temps en milieux asériques. Ces cellules selon l'invention constituent un support original et performant pour la production de molécules protéiques, notamment de protéines recombinantes à visée  
15 thérapeutique telles les anticorps, et de vaccins [virus de la vaccine (demande EP n° 03291813.8), de la grippe...] du fait de leur origine aviaire (WO03/076601). Les lignées selon l'invention présentent l'avantage de ne pas avoir subi de processus d'immortalisation par mutagenèse dirigée, virale, chimique ou par d'autres processus. Elles sont issues d'une sélection de population par des conditions de  
20 cultures et d'adaptation décrites ci-après et optimisées pour que les cellules puissent être utilisées dans des modes de production différents en suspension ou en adhérence. Les cellules souche aviaires selon l'invention présentent l'aptitude d'atteindre un nombre élevé de passages en culture sans connaître le processus de sénescence et ainsi de permettre une production de biomasse importante. Le procédé selon  
25 l'invention permet d'obtenir des densités cellulaires en milieu asérique comparables à celles obtenues dans des milieux classiques nécessitant une complémentation en sérum.

Les cellules de l'invention sont donc destinées à se substituer aux lignées actuellement employées pour différentes productions de vaccins ou de peptides ou  
30 protéines recombinantes car elles possèdent un avantage indéniable en terme réglementaire compte tenu de leur aptitude à se développer en milieux asériques

dépourvus de composés d'origine animale. L'inventeur a donc testé bon nombre de milieux asériques disponibles dans le commerce auprès de différentes sociétés spécialisées.

Enfin, l'inventeur a démontré que les cellules souches aviaires selon l'invention sont susceptibles d'entrer en différenciation de façon massive et homogène en utilisant les milieux asériques particuliers. L'invention concerne donc également les procédés de différenciation ainsi que l'utilisation de ces milieux asériques en présence d'inducteurs spécifiques pour induire la différenciation des cellules souches aviaires.

10

### DESCRIPTION

La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de lignées cellulaires aviaires capables de croître en milieu asérique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 15 a) Culture de cellules aviaires dans un milieu classique complémenté en sérum et comportant l'ensemble des facteurs permettant la croissance cellulaire. De préférence la culture cellulaire est réalisée sur un tapis de cellules nourricières inactivées (*feeder layer*),
- b) Au moins un passage en culture en modifiant le milieu de culture de sorte à  
20 obtenir un sevrage progressif ou total du sérum,
- c) établissement de lignées cellulaires adhérentes ou non-adhérentes capables de proliférer dans un milieu de base en l'absence de sérum.

Plus spécifiquement, la présente invention se rapporte à un procédé d'adaptation de cellules aviaires à un milieu asérique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes  
25 consistant à :

- a) cultiver les cellules aviaires dans un milieu de culture classique complémenté en sérum ;

b) changer le dit milieu de culture classique de l'étape a) par un milieu de culture sélectionné parmi :

- 5           • un milieu classique (i) complémenté en sérum et dilué au moyen d'un milieu asérique, puis cultiver par passages successifs les dites cellules aviaires dans le milieu (i) dans lequel la proportion de milieu asérique est progressivement augmentée jusqu'à disparition complète du milieu classique complémenté en sérum (dilution progressive) ;
- 10          • un milieu asérique complémenté en sérum (ii), puis cultiver par passages successifs les dites cellules aviaires dans le milieu (ii) dans lequel la proportion en sérum est progressivement diminuée jusqu'à l'obtention d'un milieu asérique (sevrage progressif);
- un milieu asérique (iii), puis cultiver les dites cellules aviaires dans le milieu (iii) (passage direct) ;

15          c) maintenir en culture en milieu asérique les dites cellules aviaires qui se sont adaptées au changement de milieu et qui ont été sélectionnées.

Les cellules aviaires selon l'invention sont des cellules sélectionnées parmi les cellules aviaires, souches ou primaires, adhérentes ou proliférant en suspension. Les cellules souches aviaires sont des cellules totipotentes ou pluripotentes.

20           On entend par « milieu classique », tout milieu de base nécessitant pour son utilisation au moins une complémentation en sérum de veau fœtal. Parmi ces milieux on trouve à titre d'exemple le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium et ses dérivés tel que le DMEM-F12, le HAM-F10, le HAM-F12, l'Iscove's Modified Dulbecco 's Medium, le McCoy's5A, le medium 199, le MEM, le GMEM (Glasgow Minimum Essential medium), et le RPMI 1640. Facultativement, selon la nature des  
25          cellules cultivées avec ce milieu classique, il peut être en outre nécessaire de compléter le milieu avec au moins un des composés suivants : L-glutamine, pyruvate de sodium, bêta mercaptoéthanol, acides aminés, vitamines, facteurs de croissance recombinants.

30           Les cellules aviaires, notamment les cellules souches aviaires peuvent être cultivées à l'étape a) dans un milieu classique tel que décrit dans [Pain B et al. (1996) Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with

multiple morphogenetic potentialities; Development 122 : 2339-2348], EP 787 180 et US 6,114,168. On peut également utiliser le milieu décrit dans US 5,340,740, US 5,656,479 et US 5,830,510.

On entend par « milieu asérique », un milieu, prêt à l'emploi, c'est-à-dire ne nécessitant pas l'adjonction de sérum, capable de permettre la croissance des cellules et leur maintien en culture (milieux SFM, serum-free medium). Ce milieu n'est pas forcément chimiquement défini, il peut contenir des hydrolysats d'origines variées, de plantes par exemple. De préférence, ces milieux sont dit « non animal origin » c'est à dire qu'ils ne contiennent pas d'éléments d'origine animal ou humaine (statut FAO, *free of animal origin*). Dans ces milieux, les protéines natives du sérum sont remplacées par des protéines recombinantes produites de manière synthétique ou de sources recombinantes. Parmi ces protéines on peut trouver par exemple l'insuline et/ou la transférine. Certains milieux asériques ne contiennent pas de protéine (milieux PF, pour *protein free*) et/ou sont chimiquement définis (milieux CDM pour *chemically defined medium*). Les premiers comme leur nom l'indique ne contiennent aucune protéine. Ils sont principalement développés pour la production de protéines recombinantes ou d'anticorps et facilite l'étape de purification. Les seconds ont une composition totalement définie, toutes les molécules les constituant ont leur structure chimique parfaitement connue.

Les avantages de ces milieux sont multiples car ces milieux sont dépourvus de sérum, et les risques biologiques de zoonose liés à l'utilisation du sérum sont écartés (risques d'exposition BSE et viraux) et il permettent une meilleure qualité de production liée à une meilleure traçabilité et une purification optimisée. En outre, il y a moins de variabilité entre les lots de milieux car ils sont mieux définis (milieux SFM et PF) ou totalement définis (milieux CDM).

Le procédé d'obtention et de culture de cellules aviaires capables de croître en milieu asérique selon l'invention comprend en outre l'étape d) d'isoler une (cloner) ou plusieurs cellules aviaires, puis cultiver les dites cellules aviaires isolées dans un milieu asérique. Il entre dans la portée de l'invention d'isoler, par exemple par dilution limite, une cellule aviaire obtenue par le procédé de l'invention afin d'avoir une population clonale de cellules aviaires capables de croître en milieu asérique.

Alternativement l'étape d) selon l'invention peut consister dans l'isolement de plusieurs cellules aviaires capables de croître en milieu asérique, afin d'enrichir la population de cellules aviaires obtenues par le procédé de l'invention en cellules présentant des aptitudes ou des caractéristiques particulières ou supérieures.

5            Selon un premier mode de réalisation, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que le milieu de culture (i) comprend 10% à 60% de milieu asérique et respectivement 90% à 40% de milieu de culture classique, de préférence de 25% à 50% de milieu asérique, respectivement 75% à 50% de milieu de culture classique. Egalement, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que le milieu de culture  
10        (ii) comprend entre 2 % et 7.5 % de sérum, de préférence 3%.

            La décision d'augmenter la proportion de milieu asérique dans le milieu de culture (i) ou de diminuer la proportion de sérum dans le milieu de culture (ii) est conditionnée par la vitesse de prolifération cellulaire et la morphologie des cellules aviaires en culture. Lorsque les cellules présentent des difficultés d'adaptation au  
15        milieu de culture (i), (ii) ou (iii), ou des difficultés d'adaptation au milieu (i) dans lequel la proportion de milieu asérique a été augmentée, ou au milieu (ii) dans lequel la proportion en sérum a été diminué, lors des passages successifs en culture, les dites cellules sont maintenues sur plusieurs passages dans le milieu de culture dans lequel les cellules présentent des difficultés d'adaptation, avant de poursuivre le  
20        processus de dilution ou de sevrage. En effet les cellules au cours du processus doivent conserver leur capacité à se diviser au moins toutes les 48 heures. La présence de figure mitotique est essentielle. La morphologie des cellules ne doit pas se rapprocher de celle de cellules vacuolisées, nécrosées, apoptotiques ou sénescents. Par exemple, une chute brutale du nombre de cellules vivantes (taux de  
25        mortalité observée supérieur à environ 50%) indique qu'il est nécessaire d'attendre un ou deux passages supplémentaire(s) sans modification du milieu ou avec une diminution de la concentration en sérum moins sensible.

            Selon un autre mode de réalisation préférée de l'invention, l'adaptation aux milieux asériques des cellules aviaires, notamment des cellules souches aviaires,  
30        adhérentes ou proliférant en suspension, est effectuée par sevrage total en une seule étape, sans étape préalable de dilution ou de sevrage progressif en sérum. De

préférence, les cellules sont cultivées en milieu classique comprenant de 2 à 3% de sérum avant le passage direct en milieu asérique.

Le procédé selon l'invention peut en outre comprendre une étape d'engagement en différenciation des cellules souches aviaires, adhérentes ou  
5 proliférant en suspension, consistant en l'addition dans le milieu asérique d'au moins un inducteur sélectionné parmi les inducteurs globaux acide rétinoïque et diméthylsulfoxyde (DMSO) ou spécifiques, notamment EGF, bFGF, NGF, TNF, IL6, SCF, IL11 et CNTF. Les lignées de cellules aviaires différenciées ainsi obtenues à partir des cellules aviaires selon l'invention font également partie de l'invention. Ces  
10 cellules différenciées peuvent également être des cellules précurseurs, qui correspondent aux cellules d'un tissu adulte ou embryonnaire partiellement différenciées (par opposition à une cellule souche totipotente) et qui sont à nouveau capable de se diviser et de se différencier. Ces cellules différenciées peuvent être caractérisées par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques. Par « cellule  
15 différenciée », on entend toute cellule d'un tissu adulte ou embryonnaire spécialisée, présentant des marqueurs spécifiques ou remplissant des fonctions physiologiques spécifiques. Il est possible, dans un aspect particulier de l'invention, notamment pour des isolats particuliers ou des clones issus d'un isolat particulier obtenu au cours de l'établissement, que ces cellules souches puissent contribuer à la lignée germinale.  
20 Dans ce cas, ces cellules souches établies en lignées seraient des cellules souches embryonnaires.

Le procédé selon l'invention peut ainsi conduire à l'établissement de lignées cellulaires. Dans le cadre de l'invention, on entend par « établissement d'une lignée », le maintien de cellules en culture *in vitro* sur une période considérable de  
25 temps. Avantageusement, les cellules issues des lignées obtenues à l'étape c) sont capables de proliférer pendant au moins 50 jours, 100 jours, 150 jours, 300 jours ou de préférence au moins 600 jours. Dès lors, ces lignées sont considérées comme pouvant croître indéfiniment en milieu asérique. Par « lignée », on entend toute population de cellules capables de proliférer indéfiniment en culture *in vitro* en  
30 gardant peu ou prou les mêmes caractéristiques morphologiques et phénotypiques.

Dans un deuxième aspect, l'invention porte sur l'utilisation de milieu de culture asérique, comprenant facultativement un ou plusieurs facteurs de croissance, pour la culture et la congélation de cellules aviaires, souches ou primaires, adhérentes ou non adhérentes. En effet, les lignées mentionnées ci-dessous ont  
5 montré qu'elles peuvent être amplifiées dans les conditions précitées, congelées sans sérum et remises en culture en milieu asérique.

Dans un troisième aspect, l'invention porte sur un procédé de production de vaccins, de virus ou particules virales vivants ou atténués, de peptides ou de protéines recombinantes, de préférence à visée thérapeutique telles les anticorps,  
10 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de culture de cellules aviaires en milieu asérique selon l'invention.

A cet effet, les cellules issues des lignées établies peuvent être génétiquement modifiées de manière stable ou transitoirement avec l'aide des techniques à la portée de l'homme du métier. Ainsi par exemple pour produire un peptide ou une protéine  
15 recombinante d'intérêt, telle un anticorps, les cellules selon l'invention peuvent être modifiées génétiquement de manière stable par recombinaison homologue ou par transgénèse insertionnelle. Les vecteurs de recombinaison, d'insertion et/ou d'expression permettant de réaliser ces modifications génétiques sont bien connus de l'homme du métier. Il convient de citer à titre d'exemples les vecteurs rétroviraux ou  
20 les mini-chromosomes.

Plus précisément, le procédé selon l'invention de production de virus ou de particules virales vivants ou atténués, ou l'un de leur dérivés recombinants, comprend en outre les étapes :

- d'inoculer des dites cellules aviaires avec le dit virus ou particules virales  
25 avec un coefficient m.o.i.(multiplicity of infection) compris de préférence entre 0.01 et 0.5.et,
- de cultiver les dites cellules en milieu asérique jusqu'à la lyse cellulaire et la libération de nouveaux virus ou de nouvelles particules virales dans le milieu de culture.

30 Les cellules aviaires selon l'invention sont de préférence capables de supporter la réplication de virus vivants ou atténués, recombinants ou non. Néanmoins, les cellules

selon l'invention peuvent être modifiées transitoirement ou de manière stable dans le temps par l'introduction ou l'expression du ou des composants nécessaires à l'accomplissement du cycle viral complet du virus dans la cellule. Ainsi, par exemple, les cellules peuvent être modifiées de sorte à sur-exprimer le récepteur au virus à la surface de la cellule.

Le dit virus ou particule virale, ou un de ses dérivés recombinants, est sélectionné dans le groupe composé des adénovirus, des hépadnavirus, des herpesvirus, des orthomyxovirus, des papovavirus, des paramyxovirus, des picornavirus, des poxvirus, des réovirus et des rétrovirus. Plus précisément, le poxvirus est un avipoxvirus, de préférence sélectionné parmi le fowlpox virus, le juncopox virus, le mynahpox virus, le pigeonpox virus, le canarypox virus, le psittacinepox virus, le quailpox virus, le sparrowpox virus, le starlingpox virus et le turkeypox virus. Selon un mode encore plus préféré, le poxvirus est sélectionné parmi le virus de la vaccine et le virus de la variole (smallpox), natif ou recombinant. Lorsqu'il s'agit de la vaccine, il s'agit de préférence de la souche Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) (ATCC No VR-1508).

Selon un autre mode préféré, l'orthomyxovirus, est le virus de la grippe. Selon un autre mode préféré le paramyxovirus est choisi parmi le virus de la rougeole, le virus des oreillons et le virus de la rubéole.

Le peptide ou la protéine recombinante obtenue par la mise en œuvre du procédé de production selon l'invention est également un des objets de la présente invention. Un tel peptide ou protéine peut constituer un antigène spécifique d'une pathologie d'origine virale ou bactérienne, ou constituer un marqueur antigénique d'une pathologie tumorale. A ce titre, il peut être utilisé comme vaccin. Alternativement la protéine recombinante est un anticorps monoclonal humanisé ou humain.

Le vaccin anti-infectieux obtenu par la mise en œuvre du procédé de production selon l'invention ou comprenant un peptide ou une protéine selon l'invention est également un des objets de la présente invention. De préférence, il d'agit d'un vaccin anti-grippal ou un vaccin anti-variologique.



La présente invention concerne également la culture cellulaire comprenant les cellules aviaires, souches, primaires ou différenciées, adhérentes ou non adhérentes, et un milieu asérique. De préférence cette culture cellulaire présente une densité cellulaire en milieu asérique supérieure ou égale à  $1.10^6$  cellules / ml.

5 L'invention porte également sur l'utilisation de la dite culture cellulaire pour la production par les cellules souches aviaires adhérentes ou proliférant en suspension en milieu asérique, de vaccins, de virus vivants ou atténués ou de particules virales recombinantes, de peptides ou de protéines recombinantes de préférence à visée thérapeutique telles les anticorps.

10

Des exemples non limitatifs des modes de réalisation de l'invention sont donnés ci-après.

### **FIGURES**

15

**Figures 1 A à 1 K :** Photos de cellules souches aviaires adhérentes S86N 45 à passages tardifs (entre P104 et p 142) prises après 48 heures de contact avec différents milieux asériques, supplémentés en serum.

20 **Figures 2A à 2F :** Cellules souches aviaires adhérentes S86N 45 à passages tardifs (p104 à p142) après 48 heures d'incubation en présence du milieu témoin de référence (HAM-F12 0% SVF) ou de différents milieux asériques.

**Figures 3A à 3E :** Exemple d'induction de différenciation par les milieux asériques sur les cellules souches aviaires. 4 phénotypes sont présentés à titre d'exemple d'induction massive et rapide.

**Figures 4A à 4D :** Morphologie des cellules souches aviaires Valo B à passage 15 dans différentes conditions. La photo 4A illustre la morphologie de cellules Valo B p15, après 48 heures de culture dans le milieu de référence (DMEM-F12 min 10%SVF). La photo 4B illustre ces mêmes cellules après 72 heures d'incubation

30

dans le milieu de référence sans sérum. Les photos 4C et D montrent la morphologie des cellules Valo B et la densité obtenue après une incubation de 72 heures dans deux milieux asériques.

5 **Figures 5 A à C : Exemple de différenciation induite par deux milieux asériques sur les cellules Valo B p12 après 48 heures d'incubation.**

La photo 5A illustre la morphologie type des cellules souches Valo B précoces. Les photos 5B et 5C mettent en évidence un changement morphologique très net des cellules au contact des milieux asériques, ici utilisés complémentés avec 10% SVF.

10

### EXEMPLES

#### MATERIEL ET METHODES :

15     ▪ **Les cellules utilisées :**

***Cellules EB1 et EB14 :***

Cellules souches aviaires issues d'embryons de poulet de la souche S86N maintenues en culture long terme et proliférant en suspension. Ces cellules sont cultivées dans différents milieux commerciaux (préférentiellement DMEM-F12, McCoy's 5A, HAMF12) complémentés en 10% sérum de veau foetal (SVF), en glutamine (2mM), en acides aminés 1%, en vitamines 1%, en sodium pyruvate 1mM, et en beta mercapto ethanol (1mM). La technique d'obtention de ces cellules a été précédemment décrite (WO03/076601 et FR02/02945).

25 ***Cellules S86N 45 et S86N 16 :***

Cellules souches aviaires issues d'embryons de poulet de la souche S86N maintenues en culture long terme au delà de 140 passages. Ces cellules adhérentes sont indépendantes pour leur prolifération de facteurs spécifiques et de feeder. La technique d'obtention de ces cellules a été précédemment décrite (WO03/076601 et FR02/02945).

30

**Cellules ValoB :**

Cellules souches aviaires adhérentes issues d'embryons de poulet de la souche White Legorn, maintenues en culture en présence de facteurs et d'une couche de cellules  
5 nourricières (feeder). Elles sont utilisées à passage 12 et 15. Leur croissance se caractérise par leur dépendance en IGF1 (Insulin Growth Factor 1), CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) et en feeder. Ces cellules ont été développées selon la technique décrite dans les textes WO03/076601 et FR02/02945.

**10 Cellules STO :**

Lignée de fibroblastes de souris (CRL-1503, fournisseur ATCC). Ces cellules sont utilisées après irradiation (45 grey) en tant que cellules nourricières. L'irradiation permet d'arrêter définitivement le cycle cellulaire de façon à empêcher l'envahissement par les cellules STO des co-cultures de cellules souches aviaires.  
15 Ces cellules irradiées secrètent entre autre des facteurs de croissance importants pour le maintien en culture des souches en culture (Robertson, 1987) ainsi qu'une matrice extra-cellulaire aidant à l'adhésion des cellules.

Le feeder STO irradié estensemencé 24 heures avant utilisation des plaques 6 puits utilisées dans le cadre de nos tests.  $0,2 \cdot 10^6$  cellules sontensemencées par puits sous 2  
20 ml.

▪ **Les milieux classiques commerciaux utilisés :**

**Milieu de culture pour l'entretien de cellules S86N 45 :** HamF12, complémenté  
25 par 10% SVF, par la glutamine 2mM, par les acides aminés 1%, par les vitamines 1%, par le sodium pyruvate 1mM, par le beta mercapto ethanol 1mM.

**Milieu de culture pour l'entretien des cellules ValoB :** DMEM F12, complémenté par 10% SVF, par la glutamine 2mM, par les acides aminés 1%, par les vitamines  
30 1%, par le sodium pyruvate 1mM, le beta Mercapto ethanol 1mM, 1ng/mL d'IGF1 et 1ng/mL de CNTF. Ce milieu est nommé DMEMF12 min, 10% SVF.

**Milieu de culture pour les cellules STO :** DMEM, complémenté par 4% de SVF et par de la glutamine 2 mM.

- 5 Les cellules souches aviaires sont maintenues à 39°C à 7,5% de CO<sub>2</sub> et les cellules STO sont maintenues à 37°C, à 7,5% de CO<sub>2</sub>.

▪ **Les milieux asériques utilisés :**

10

Les milieux asériques testés sont fournis par différentes sociétés spécialisées dans le domaine de la culture cellulaire. Parmi ceux testés, on trouve:

- 15 Société InVitrogen : VP SFM (Réf 11681-020, catalogue 2003), Opti Pro (Réf 12309-019, catalogue 2003), Episerf (Réf 10732-022, catalogue 2003) ;

Société Cambrex : Pro 293 S-CDM (réf 12765Q, catalogue 2003), LC17 Réf BESP302Q, hors catalogue), Pro CHO 5-CDM (réf 12-766Q, catalogue 2003) ;

- 20 Société Hyclone : HyQ SFM4CHO (réf SH30515-02), HyQ SFM4CHO-Utility (Réf SH30516.02), HyQ PF293 (réf. SH30356.02), HyQ PF Vero (réf SH30352.02) ;

- 25 Société JRH Biosciences: Ex cell 293 medium (Réf 14570-1000M), Ex cell 325 PF CHO Protein free medium (Réf 14335-1000M), Ex cell VPRO medium (Réf 14560-1000M), Ex cell 302 serum free medium (Réf 14312-1000M).

Ils ont tous été utilisés sans aucune complémentation mis à part les complémentations de sérum décrite dans les exemples.

## **EXEMPLE 1: PROCEDE D'OBTENTION DE CULTURE DE CELLULES AVIAIRES EN MILIEU ASERIQUE.**

### **1. Résultats**

- 5 Certains milieux asériques développés pour des lignées spécifiques n'étant ni des cellules souches, ni des cellules d'origine aviaire, ne sont pas toxiques pour les cellules souches aviaires (voir Figure 1).

10 Les cellules S86N 45 sontensemencées dans des plaques 6 puits dans différentes conditions.  $0,2 \cdot 10^6$  cellules sontensemencées par puits sous 5 ml du milieu témoin de référence (le milieu HAM-F12 10% SVF servant aux entretiens) ou dans différents milieux asériques complémentés par 10% de SVF (voir Figures 1A à 1K). Aucune adaptation à ces milieux asériques qu'ils soient SFM, PF ou CDM n'a été effectuée. Les cellules ont été directementensemencées dans ceux-ci. Les milieux  
15 sont changés tous les jours.

L'évaluation des milieux asériques tient compte de la viabilité des cellules à 24 H et à 48 H après ensemencement, de leur morphologie et de leur densité.

- 20 Sur les 14 milieux testés, 11 permettent une bonne prolifération des cellules aviaires (voir tableau I). Les Figures 1A à 1K illustrent les résultats obtenus avec certains d'entre eux. Nous avons constaté que 3 milieux asériques testés induisent une très forte mortalité des cellules souches aviaires, même s'ils sont complémentés en 10% serum. La toxicité de ces milieux est telle que pratiquement aucune cellule ne  
25 persiste dans les puits de culture après 2 jours de culture.

Nous avons également observé que globalement la prolifération des cellules souches aviaires adhérentes est au moins égale à celle obtenue en milieu de référence (milieu HAMF12 complémenté en sérum et additifs (voir Matériel et Méthodes). Lorsque  
30 ces milieux asériques sont complémentés par 5% de SVF au lieu de 10%, aucune différence significative de prolifération n'est visible. Ce n'est pas le cas si le milieu

de référence n'est complémenté qu'en 5% de sérum, la prolifération est ralentie pendant un temps nécessaire à une adaptation.

Société fournisseur	Milieux	Prolifération en présence de 10% serum	changement de morphologie
In vitrogen	VP-SFM	+++	non significatif
	Opti PRO	+++	significatif
	Episerf	+++	significatif
JRH Biosciences	Ex cell 293	non	nd
	Ex cell 325 PF CHO	+++	non significatif
	Ex cell VPRO	non	nd
	Ex cell 302 serum free	++	non significatif
Hyclone	HyQ SFM4CHO	non	nd
	HyQ SFM4CHO-Utility	+++	significatif
	HyQ PF293	++	non significatif
	HyQ PF Vero	, +	significatif
CAMBREX	Pro 293 S-CDM	+++	non significatif
	LC17	+++	non significatif
	Pro CHO 5-CDM	++	non significatif

- 5 **Tableau 1 : Synthèse des résultats obtenus avec les différents milieux asériques complémentés en serum, en terme de prolifération et de morphologie. Ces résultats ont été obtenus sur les cellules S86N 45.**

+++ : prolifération plus importante que le milieu de base classique complémenté spécifiquement/

- 10 ++ : prolifération équivalente à celle obtenue dans le milieu de base classique complémenté spécifiquement/ + : prolifération inférieure à celle obtenue dans le milieu de base classique complémenté spécifiquement.

- 15 **EXEMPLE 2 : OBTENTION DE CULTURES DE CELLULES SOUCHES AVIAIRES ADHERENTES EN MILIEU ASERIQUE A PARTIR DE CELLULES SOUCHES AVIAIRES A PASSAGES TARDIFS.**

Nous avons démontré que les souches aviaires adhérentes à passages tardifs peuvent proliférer dans certains milieux asériques, sans addition de sérum et sans d'adaptation (Figures 2B à 2F). Elles ne prolifèrent en aucun cas dans le milieu de référence sans sérum dans lequel toutes les cellules sont mortes après 48 heures (Figure 2A).

Les cellules S86N 45 sontensemencées dans des plaques 6 puits dans différentes conditions.  $0,2 \cdot 10^6$  cellules sontensemencées par puits sous 5 ml du milieu témoin de référence (le milieu HAMF12 sans addition de sérum) ou dans différents milieux asériques sans aucune addition de suppléments de culture. Aucune adaptation à ces milieux asériques qu'ils soient SFM, PF ou CDM n'a été effectuée. Les cellules ont été directementensemencées dans ceux-ci. Les milieux sont changés tous les jours. L'évaluation des milieux asériques tient compte de la viabilité des cellules à 24 heures et à 48 heures aprèsensemencement, de leur morphologie et de leur densité.

Nous avons ainsi mis en évidence que parmi les 14 milieux asériques testés, 5 d'entre eux permettent, sans aucune adaptation, une croissance des cellules sur 48 heures et un maintien en culture sans sérum.

### **EXEMPLE 3 : INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES AVIAIRES DE L'EXEMPLE 2 EN MILIEU ASERIQUE.**

Nous avons démontré que les souches aviaires adhérentes à passages tardifs peuvent être induites rapidement, massivement et de façon homogène dans différentes voies de différenciation par certains milieux asériques en présence ou non de sérum (Figure 3).

Cette mise en évidence s'est faite dans le cadre de nos tests d'évaluation des différents milieux asériques à notre disposition.

Les cellules S86N 45 sontensemencées dans des plaques 6 puits dans différentes conditions.  $0,2 \cdot 10^6$  cellules sontensemencées par puits sous 5 ml du milieu témoin

de référence (le milieu HAM-F12 complémenté en 10% sérum) ou dans différents milieux asériques sans aucune addition de suppléments de culture ou en présence de 10% de sérum (voir figure 3). Aucune adaptation à ces milieux asériques qu'ils soient SFM, PF ou CDM n'a été effectuée. Les cellules ont été directement  
 5 ensemencées dans ceux-ci. Les milieux sont changés tous les jours. La morphologie des cellules est observée chaque jour après ensemencement. Des différences notables dès 24 heures de culture ont été mises en évidence. Les différents phénotypes obtenus sont illustrés par les Figures 3B à 3E. La morphologie de référence de cellules souches aviaires non différenciées à passage tardif est caractérisée par la  
 10 Figure 3A.

Parmi les principaux phénomènes de différenciation répertoriés, on trouve à titre d'exemple :

- \* la rétraction des petits prolongements cytoplasmiques caractéristiques de nos  
 15 cellules souches aviaires (voir Figure 3B).
- \* l'apparition de prolongement type « neurite » (voir Figure 3C)
- \* le changement de forme des cellules qui deviennent plus cubiques (Figure 3E)
- \* l'allongement et l'étalement des cellules (Figure 3D)

20

#### **EXEMPLE 4 : OBTENTION DE CULTURES DE CELLULES SOUCHES AVIAIRES ADHERENTES EN MILIEU ASERIQUE A PARTIR DE CELLULES SOUCHES AVIAIRES A PASSAGE PRECOCE.**

25 Nous avons démontré que les souches aviaires adhérentes à passage précoce peuvent proliférer dans certains milieux asériques, avec ou sans addition de sérum et sans d'adaptation (Figures 4C et 4D). Elles ne prolifèrent en aucun cas dans le milieu de référence sans sérum dans lequel toutes les cellules sont mortes après 72 heures de culture (Figures 4B).

30



- Les cellules Valo B passage 15 sontensemencées dans des plaques 6 puits dans différentes conditions. Ces plaques 6 puits ont été préparées au moins 24 heures avant leur utilisation, chaque puits ayant étéensemencé par  $0,2 \cdot 10^6$  de cellules STO irradiées à 45 grey. A J0,  $0,2 \cdot 10^6$  cellules souches précoces sontensemencées par puits sous 5 ml du milieu HAMF12 de référence (complémenté en facteurs et complémenté ou non en sérum) ou dans différents milieux asériques complémentés ou non par 10% de SVF. Aucune adaptation à ces milieux asériques qu'ils soient SFM, PF ou CDM n'a été effectuée. Les cellules ont été directementensemencées dans ceux-ci. Les milieux sont changés tous les jours.
- 10 L'évaluation des milieux asériques tient compte de la viabilité des cellules à 24, 48 et 72 heures aprèsensemencement, de leur morphologie et de leur densité.

- Il a été démontré tout comme pour les cellules aviaires S86N 45 que des cellules souches aviaires précoces étaient capables de proliférer dans les milieux asériques non complémentés en sérum. Certains sont cependant très toxiques. Ces évaluations de milieux nous ont permis de mettre en évidence la possibilité de cultiver les cellules aviaires souches précoces directement sans aucune adaptation dans certains milieux asériques (Figures 4C et 4D) sans complémentation en sérum.

20

**EXEMPLE 5 : INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES AVIAIRES DE L'EXEMPLE 4 EN MILIEU ASERIQUE.**

- Les cellules souches aviaires précoces sont induites par certains milieux asériques dans des voies de différenciation multiples (Voir Figures 5).

- Les cellules Valo B passage 12 sontensemencées dans des plaques 6 puits dans différentes conditions. Ces plaques 6 puits ont été préparées au moins 24 heures avant leur utilisation, chaque puits ayant étéensemencé par  $0,2 \cdot 10^6$  de cellules STO irradiées à 45 grey. A J0,  $0,2 \cdot 10^6$  cellules souches aviaires précoces sontensemencées par puits sous 5 ml du milieu HAMF12 de référence (complémenté en

facteurs et complémenté ou non en sérum) ou dans différents milieux asériques complémenté ou non par 10% de SVF. Aucune adaptation à ces milieux asériques qu'ils soient SFM, PF ou CDM n'a été effectuée. Les cellules ont été directement ensemencées dans ceux-ci. Les milieux sont changés tous les jours.

5

Nous avons observé que certains milieux asériques en présence de sérum sont capables d'induire des différenciations massives et homogènes des cellules souches aviaires valo B p12. (Figures 5B et C). Cette induction en différenciation se produit également en absence de sérum (Figure 4C).

10

#### **EXEMPLE 6 : ADAPTATION PROGRESSIVE DES CELLULES SOUCHES AVIAIRES AUX MILIEUX ASERIQUES**

15 Les cellules souches aviaires adhérentes ou proliférant en suspension qu'elles soient à passages tardifs ou précoces peuvent être adaptées à différents milieux asériques sur plusieurs passages. Cette adaptation peut être réalisée selon deux protocoles distincts :

20 1- La dilution progressive du milieu de référence (en général complémenté en sérum, glutamine, vitamines, sodium pyruvate, acides aminés non essentiels, beta mercapto et possiblement en facteurs) dans du milieu aérique: c'est la technique de la dilution progressive.

25 2- Le passage direct en milieu asérique complémenté en sérum suivi d'un sevrage progressif en sérum : c'est la technique du sevrage progressif.

Les deux techniques permettent après un sevrage progressif mené sur 2 à 3 passages et plus d'obtenir des cellules souches aviaires adhérentes ou en suspension  
30 proliférant dans le milieu asérique.

### **6.1 Exemples d'adaptation par dilution progressive :**

T0 : détermine le nombre de passage qu'a subi la lignée avant le début de l'adaptation.

5 Dans ce processus le milieu asérique utilisé n'est pas complémenté en sérum avant utilisation.

**Passage T0 :** les cellules souches aviaires adhérentes ou en suspension sont cultivées dans un mélange 75% de milieu de référence/25% de milieu asérique. Le milieu est changé selon les mêmes proportions tous les jours pour les cellules adhérentes. Pour  
10 les cellules en suspension du milieu est ajouté selon les mêmes proportions dans les cultures.

**Passage T+1 :** après dissociation des cellules adhérentes (ou dilution des cellules en suspension) les cellules sont incubées dans un mélange constitué de 50% du milieu de référence et de 50% du milieu asérique. Le milieu est changé selon les mêmes  
15 proportions tous les jours pour les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension du milieu est ajouté selon les mêmes proportions dans les cultures.

**Passage T+2 :** après dissociation des cellules adhérentes (ou dilution des cellules en suspension) les cellules sont incubées dans un mélange constitué de 25% du milieu de référence et de 75% du milieu asérique. Le milieu est changé selon les mêmes  
20 proportions tous les jours pour les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension du milieu est ajouté selon les mêmes proportions dans les cultures.

**Passage T+3 :** après dissociation des cellules adhérentes (ou dilution s'il s'agit de cellules en suspension) les cellules sont incubées dans le milieu asérique pur.

25 Les critères permettant le passage d'une étape à la suivante sont principalement la vitesse de prolifération et la morphologie compte tenu qu'il s'agit de cellules souches aviaires.

Il est important d'éviter les sélections de population trop drastiques et l'induction de mortalité. En effet, les cellules au cours du processus doivent conserver leur capacité à se diviser au moins toutes les 48 heures. La présence de figure mitotique est  
30 essentielle. La morphologie des cellules ne doit pas se rapprocher de celle de cellules vacuolisées, nécrosées, apoptotiques ou sénescents.

Si les cellules présentent des difficultés d'adaptation à une étape il est important de maintenir celles-ci sur plusieurs passages dans le mélange posant problème avant de poursuivre le processus de sevrage. Le milieu n'est alors renouvelé que de moitié en ce qui concerne les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension le volume  
 5 ajouté quotidiennement est diminué. Il est également possible dans des cas plus compliqués d'ajouter des étapes intermédiaires dans le sevrage par dilution progressive.

Une variabilité importante des performances des milieux asériques nous a amené à conclure que dans certains cas toutes ces étapes constituant le processus de sevrage  
 10 par dilution n'étaient pas indispensables ; plus particulièrement l'étape à passage T0 (mélange 75% de milieu de référence/ 25% de milieu asérique) ne semble pas un passage obligé. L'adaptation débute alors directement avec le mélange 50% de milieu de référence/ 50% de milieu asérique et se poursuit selon le schéma indiqué.

## 15 **6.2 Exemples d'adaptation par sevrage en sérum :**

**Passage T0 :** les cellules souches aviaires adhérentes ou en suspension sont cultivées dans le milieu asérique complémenté en 5% SVF. Le milieu est changé tous les jours pour les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension du milieu est ajouté tous les jours dans les cultures.

20 **Passage T+1 :** après dissociation des cellules adhérentes (ou dilution des cellules en suspension) les cellules sont incubées dans du milieu asérique complémenté par 2,5% de SVF. Le milieu est changé tous les jours pour les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension du milieu est ajouté quotidiennement dans les cultures.

**Passage T+2 :** après dissociation des cellules adhérentes (ou dilution des cellules en  
 25 suspension) les cellules sont incubées dans du milieu asérique complémenté par 1,25% de SVF. Le milieu est changé tous les jours pour les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension du milieu est ajouté quotidiennement dans les cultures.

**Passage T+3 :** après dissociation des cellules adhérentes (ou dilution s'il s'agit de cellules en suspension) les cellules sont incubées dans le milieu asérique pur.

Si les cellules présentent des difficultés d'adaptation à une étape il est important de maintenir celles-ci sur plusieurs passages dans le mélange posant problème avant de poursuivre le processus de sevrage en sérum. Le milieu n'est alors renouvelé que de moitié en ce qui concerne les cellules adhérentes. Pour les cellules en suspension le volume ajouté quotidiennement est diminué. Il est également possible dans des cas plus compliqués d'ajouter des étapes intermédiaires dans ce sevrage progressif.

Une variabilité importante des performances des milieux asériques nous a amené à conclure que dans certains cas toutes ces étapes constituant le processus de sevrage en sérum n'étaient pas indispensables ; plus particulièrement l'étape à passage T (milieu asérique complémenté en 5% sérum) ne semble pas un passage obligé. L'adaptation débute alors directement avec le milieu asérique complémenté en 3% sérum, puis peut se poursuivre par une étape en milieu asérique complémenté par 2% puis par 1% de sérum.

#### **EXEMPLE 7 : ADAPTATION DIRECTE DES CELLULES SOUCHES AVIAIRES ADHERENTES OU EN SUSPENSION AUX MILIEUX ASERIQUES**

Les cellules souches aviaires adhérentes ou proliférant en suspension qu'elles soient à passages tardifs ou précoces peuvent être cultivées directement dans différents milieux asériques. Deux techniques peuvent être pratiquées.

##### **Première technique :**

Les cellules souches aviaires adhérentes ou en suspension peuvent être adaptées directement à partir du milieu de référence habituellement complémenté par 10% de sérum sans aucune étape intermédiaire.

Le passage en milieu asérique se fait alors en une seule étape. Pour les cellules souches aviaires adhérentes le milieu asérique n'est pas renouvelé systématiquement pendant les premiers jours de culture suivants. On préférera tout de même en renouveler au moins la moitié de façon à habituer les cellules plus rapidement à de futurs changement totaux. Pour les cellules souches aviaires en suspension du milieu

asérique n'est pas systématiquement additionné tous les jours. On préférera tout de même ajouter de petite quantité de milieu asérique (au moins 25% du volume total) jusqu'à la première dilution. Si les cellules ne subissent aucune crise majeure de grands volumes peuvent être additionnées sur les étapes de dilutions suivantes.

5

### **Deuxième technique :**

Les cellules souches aviaires adhérentes ou en suspension peuvent être préalablement habituées à un milieu moins riche en sérum avant le passage en milieu asérique.

- 10 Cette étape permet d'habituer les cellules à proliférer dans un milieu pauvre en sérum ce qui facilite le sevrage direct en une seule étape.

Ce sevrage en sérum se fait progressivement, passage après passage, jusqu'à obtenir des cellules proliférant en 3 à 2 % de sérum puis le changement brutal en milieu asérique est effectué. Le passage en milieu asérique se fait alors en une seule étape.

- 15 Pour les cellules souches aviaires adhérentes le milieu asérique n'est pas renouvelé systématiquement pendant les premiers jours de culture suivants. On préférera tout de même en renouveler au moins la moitié de façon à habituer les cellules plus rapidement à de futurs changement totaux. Pour les cellules souches aviaires en suspension du milieu asérique n'est pas systématiquement additionné tous les jours.

- 20 On préférera tout de même ajouter de petite quantité de milieu asérique (au moins 25% du volume total) jusqu'à la première dilution. Si les cellules ne subissent aucune crise majeure de grands volumes peuvent être additionnés sur les étapes de dilutions suivantes.

- 25 Le choix de la technique d'adaptation en une seule étape est fonction des performances des milieux asériques testés. Dans le cas d'un milieu asérique performant (en terme de prolifération, d'adhésion cellulaire et différenciation) la première technique sera privilégiée. Dans le cas d'un milieu asérique avec de faibles performances la deuxième technique sera plutôt pratiquée.

30

### **EXEMPLE 8 : CONGELATION DES CELLULES SOUCHES AVIAIRES ADHERENTES ET EN SUSPENSION SANS SERUM**

Les cellules sont cultivées en milieu asérique. Elles sont congelées lorsqu'elles sont  
5 en phase exponentielle de croissance.

Les cellules adhérentes sont dissociées, numérées, et reprises entre 10 à 20 millions  
de cellules par mL dans un volume X de surnageant conditionné récolté avant  
dissociation. On obtient une suspension cellulaire. Un volume de milieu asérique  
frais complémenté par 20% de DMSO (Diméthyl sulfoxide), équivalent au volume x,  
10 est ajouté goutte à gouttes sur la suspension cellulaire. Ainsi le mélange final  
contient 10% de DMSO. Les cellules sont ensuite réparties dans des cryotubes (de 3  
à 20 millions par cryotube), placées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans des systèmes permettant un  
abaissement de la température de 1 degré par minute. Après 24 heures à  $-80^{\circ}\text{C}$ , les  
cellules peuvent être placées à l'azote.

15 Le même protocole est appliqué pour les cellules souches aviaires proliférant en  
suspension si ce n'est qu'elles sont dans une première étape dissociées  
mécaniquement avant numération et congélation.

### **EXEMPLE 9 : CONTROLE DU NIVEAU DE SERUM POUR LA PROLIFERATION DES LIGNEES**

Lors de l'obtention de ces lignées, les milieux de culture utilisés sont des milieux de  
culture classiques comprenant une base (DMEM, GMEM, HAM-F12, McCoy,  
etc...) supplémentée de différents additifs tels que des acides aminés non essentiels,  
25 des vitamines, du pyruvate de sodium. Ce milieu complexe comprend du sérum de  
veau foetal, qui demeure un élément central de la culture, même si des composants de  
différentes origines dont des composants végétaux peuvent être progressivement  
utilisés. Un processus pour contrôler et habituer les cellules à des proportions  
relativement faibles de sérum de veau foetal est présenté. On parvient ainsi à  
30 maintenir des cellules en prolifération importante (Temps de division  $> 1$ ) avec des

pourcentages de sérum faible (2% par exemple dans le cas des cellules S86N 16). Le temps de doublement et les temps moyens de division ont été également calculés et portés dans le tableau II. On notera que le temps moyen de division augmente en fonction de la diminution relative de sérum. Une phase de rattrapage est néanmoins observée après quelques temps en culture dans les conditions mentionnées. Ce temps reste néanmoins inférieure à 24h ( $d > 1$ ), ce qui représente déjà une prolifération très intéressante en terme industriel même à des concentrations de sérum de 2 %, ce qui est déjà relativement faible. Des améliorations quant aux différents métabolites à utiliser peuvent être envisagées pour accroître ce temps et encore optimiser davantage les conditions de culture.

**Tableau II :**

Condition	10%	7,5%	3,75%	2%
d	2,02	1,51	1,47	1,08
TMD	11,9	15,8	16,3	22,2

Les exemples sont pris entre les passages p204 et p179 pour la condition 10%, entre p198 et p176 pour le 7,5%, entre p224 et p201 pour le 3,75 % et entre p216 et p199 pour le 2%.

#### **EXEMPLE 10 : INFECTION DES CULTURES CELLULAIRES AVIAIRES EN MILIEU ASERIQUE**

Les cellules adhérentes et non adhérentes sont infectables par différents virus et rétrovirus dont les virus et rétrovirus aviaires. Ces cellules peuvent ainsi servir de support de réplication pour la production de stocks viraux destinés à la production de vaccins humains et vétérinaires vivants, atténués ou inactivés selon les cas. Parmi les virus d'intérêt, on peut citer ceux de la famille des adénovirus (comme Human Adenovirus C, Fowl Adenovirus A, Ovine adénovirus D, Turkey Adenovirus B), des circoviridés (comme Chicken Anemia Virus, CAV), certains coronavirus, comme le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV), les flavivirus (comme Yellow fever virus et hepatitis C virus), les hepadnavirus (comme Hepatitis B virus et



Avihepadnavirus tel que Duck hepatitis B virus); les herpesvirus (comme les Gallid  
 herpesvirus, HSV (Herpes simplex virus) et Human herpesvirus 1, 3 et 5), les  
 orthomyxovirus (comme le virus de la grippe : Influenzavirus A, Influenzavirus B et  
 Influenzavirus C), les papovavirus (comme polyomavirus et plus particulièrement  
 5 Simian virus 40), les paramyxovirus (comme les virus de la rougeole, des oreillons,  
 de la rubéole et comme les respirovirus et pneumovirus tel que Human respiratory  
 syncytial virus et Metapneumovirus tel que Avian pneumovirus), les picornavirus  
 (comme le virus de la polio, de l'hépatite A, et tel que Encephalomyocarditis virus et  
 Foot-and-mouth disease virus), les poxvirus, (comme les fowlpox virus et les avipox  
 10 dont les canaripox, les Juncopox virus, les Mynahpox virus, les Pigeonpox virus, les  
 Psittacinepox virus, les Quailpox virus, les Sparrowpox virus, les Starlingpox virus,  
 les Turkeypox virus), les reovirus (comme les rotavirus), les rétrovirus (comme les  
 ALV, avian leukosis virus, les Gammaretrovirus tel que Murine leukaemia virus, les  
 Lentivirus tel que Human immunodeficiency virus 1 et 2) et les Togaviridae tel que  
 15 Rubivirus, notamment Rubella virus.

**EXEMPLE 11: PROTOCOLE D'INFECTION DES CULTURES**  
**CELLULAIRES AVIAIRES NON ADHERENTES EN MILIEU ASERIQUE**  
**PAR UN VIRUS**

20

▪ **Amplification des cellules :**

Les cellules EB1 ou EB14 adaptées en milieu asérique peuvent êtreensemencées à  
 une concentration de  $0.2 \cdot 10^6$  cellules/ml pour un volume initial de 50 ml en général.  
 Elles sont maintenues en culture à 39°C et à 7.5 % de CO<sub>2</sub>, sous agitation. Du milieu  
 25 neuf est ajouté chaque jour pendant les 3 à 4 jours que durent l'amplification pour  
 atteindre une concentration cellulaire de 1 à  $3 \times 10^6$  cellules /ml pour un volume final  
 de culture de 100 à 250 ml.

Les cellules en suspension sont prélevées et centrifugées pendant 10 min à 1000 rpm  
 environ. Le culot est resuspendu dans 20 à 50 ml de PBS 1X (Phosphate buffer Salt).  
 30 Les cellules sont alors comptées, centrifugées et les cellules en culot sont reprises

dans le milieu asérique à une concentration finale de 3 à  $5.10^6$  cellules/ml. Plusieurs tubes sont alors préparés dans ces conditions contenant de 3 à  $5.10^6$  cellules par tube.

▪ **Préparation du virus et infection :**

- 5 Le stock viral de titre connu est décongelé rapidement à 37°C et dilué dans le milieu asérique à un titre de 10x à 1000 x la concentration nécessaire à l'infection finale. Les cellules sont infectées par le virus d'intérêt à une m.o.i. (multiplicity of infection) de 0.01 à 0.5 selon les types de virus, ce qui fait ajouter entre 0,1 et 10% volume/volume de suspension virale au culot cellulaire. Après 1 heure d'incubation à la température
- 10 optimale pour le virus, en général de 33 à 37°C, les cellules sont centrifugées à nouveau et le milieu enlevé avec précaution. Cette étape s'avère souvent nécessaire pour limiter l'effet du virus initial dans le processus ultérieur. Une des possibilités est de diluer directement les cellules sans les centrifuger à nouveau avec du milieu asérique à une concentration finale de 0,2 à  $1.10^6$  cellules/ml et remises en incubation.

15

▪ **Récolte du surnageant et des cellules :**

- Après 2 à 4 jours d'incubation, selon les cinétiques virales et l'effet cytopathique éventuel de certains virus, le milieu contenant les cellules ou les débris cellulaires est récolté. Selon les virus, seul le culot ou le surnageant peut être intéressant et contenir
- 20 les particules virales. Les cellules sont récoltées et centrifugées. Le surnageant recueilli est centrifugé de nouveau 5 à 10 minutes à 2500 rpm, et conservé à -80°C avant la purification des particules. Un aliquot est prélevé pour la réalisation du titrage. Le culot cellulaire est repris dans 5 ml de milieu asérique, soniqué, et centrifugé 5 à 10 minutes à 2500 rpm. Le surnageant obtenu est conservé à -80°C
- 25 jusqu'à la purification et le titrage d'un aliquot. Les efficacités d'infection et de production virales sont comparées entre les différentes conditions réalisées. Pour les virus à effets cytopathiques, les titrages sont en général réalisés par la technique des plages de lyse.

**EXEMPLE 12 : PROTOCOLE D'INFECTION D'UNE CULTURE CELLULAIRE AVIAIRE ADHERENTE EN MILIEU ASERIQUE PAR UN VIRUS**

5      ■ **Préparation des cellules :**

Les cellules (S86N 45), préalablement adaptées à un milieu asérique, sont ensemencées 24 heures avant l'infection dans des flacons T75 à une concentration comprise entre 0.03 et  $0,06 \cdot 10^6$  cellules/cm<sup>2</sup> dans un milieu asérique. Elles sont maintenues à 39°C et 7,5% CO<sub>2</sub>.

10

■ **Infection :**

Le stock viral de titre connu est décongelé rapidement à 37°C et dilué dans du milieu asérique à un titre de 10x à 1000x la concentration nécessaire à l'infection finale. Les cellules sont infectées par le virus d'intérêt à une m.o.i. (*multiplicity of infection*) de 0,01 à 0,5 selon les types de virus, ce qui fait ajouter entre 0,1 et 10% volume/volume de suspension virale au culot cellulaire. L'infection est en général réalisée dans un minimum de milieu (de 5 à 10 ml pour un flacon de 75 cm<sup>2</sup>). Après 1 heure d'incubation à la température optimale pour le virus, en général de 33 à 37°C, 20 ml de milieu asérique sont rajoutés dans les flacons. Dans un cas particulier, les cellules peuvent être lavées avec du PBS pour éliminer les particules qui ne seraient pas attachées aux cellules. Dans le cas d'un virus cytopathique, les cellules sont observées quotidiennement après l'infection pour suivre l'apparition de plage de lyse cellulaire, indicatrice du bon déroulement de l'infection.

20

25      ■ **Récolte du surnageant et des cellules :**

Après 2 à 4 jours d'incubation selon les cinétiques virales et l'effet cytopathique éventuel de certains virus, le milieu contenant le surnageant, les cellules et les débris cellulaires sont récoltés. Selon les virus, seul le culot ou le surnageant peut être intéressant et contenir les particules virales. Les cellules sont récoltées et centrifugées. Le surnageant recueilli est centrifugé de nouveau 5 à 10 minutes à 2500 rpm, et conservé à -80°C avant la purification des particules. Un aliquot est prélevé

30

pour la réalisation du titrage. Le culot cellulaire est repris dans 5 ml de milieu asérique, soniqué, et centrifugé 5 à 10 minutes à 2500 rpm. Le surnageant obtenu est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la purification et le titrage d'un aliquot. Les efficacités d'infection et de production virales sont comparées entre les différentes conditions réalisées. Pour les virus à effet cytopathique, les titrages sont en général réalisés par la technique des plages de lyse.

### REVENDICATIONS

1. Procédé d'adaptation de cellules aviaires à un milieu asérique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :
  - 5 a) cultiver les cellules aviaires dans un milieu de culture classique complétement en sérum ;
  - b) changer le dit milieu de culture classique de l'étape a) par un milieu de culture sélectionné parmi :
    - 10 • un milieu classique (i) complétement en sérum et dilué au moyen d'un milieu asérique, puis cultiver par passages successifs les dites cellules aviaires dans le milieu (i) dans lequel la proportion de milieu asérique est progressivement augmentée jusqu'à disparition complète du milieu classique complétement en sérum (dilution progressive) ;
    - 15 • un milieu asérique complétement en sérum (ii), puis cultiver par passages successifs les dites cellules aviaires dans le milieu (ii) dans lequel la proportion en sérum est progressivement diminuée jusqu'à l'obtention d'un milieu asérique (sevrage progressif);
    - un milieu asérique (iii), puis cultiver les dites cellules aviaires dans le milieu (iii) (passage direct) ;
  - 20 c) maintenir en culture en milieu asérique les dites cellules aviaires qui se sont adaptées au changement de milieu et qui ont été sélectionnées.
2. Procédé d'obtention et de culture de cellules aviaires capables de croître en milieu asérique comprenant les étapes a), b) et c) définies à la revendication 1 comprenant  
25 en outre l'étape d) d'isoler une (cloner) ou plusieurs cellules aviaires, puis cultiver les dites cellules aviaires isolées dans un milieu asérique.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le milieu de culture (i) comprend 10% à 60% de milieu asérique et respectivement 90% à 40% de  
30 milieu de culture classique, de préférence de 25% à 50% de milieu asérique, respectivement 75% à 50% de milieu de culture classique.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le milieu de culture (ii) comprend entre 2 % et 7.5 % de sérum, de préférence 3%.
- 5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les cellules sont des cellules sélectionnées parmi les cellules aviaires, souches ou primaires, adhérentes ou proliférant en suspension.
- 10 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la décision d'augmenter la proportion de milieu asérique dans le milieu de culture (i) ou de diminuer la proportion de sérum dans le milieu de culture (ii) est conditionnée par la vitesse de prolifération cellulaire et la morphologie des cellules aviaires en culture.
- 15 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que lorsque les cellules présentent :
- des difficultés d'adaptation au milieu de culture (i), (ii) ou (iii), ou
  - des difficultés d'adaptation au milieu (i) dans lequel la proportion de milieu asérique a été augmentée, ou au milieu (ii) dans lequel la proportion en sérum a été diminué, lors des passages successifs en culture,
- 20 les dites cellules sont maintenues sur plusieurs passages dans le milieu de culture dans lequel les cellules présentent des difficultés d'adaptation, avant de poursuivre le processus de dilution ou de sevrage.
- 25 8. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'adaptation aux milieux asériques des cellules aviaires, notamment des cellules souches aviaires, adhérentes ou proliférant en suspension, est effectuée par sevrage total en une seule étape, sans étape préalable de dilution ou de sevrage progressif en sérum.
- 30 9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que les cellules sont cultivées en milieu classique comprenant de 2 à 3% de sérum avant le passage en milieu asérique.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 comprenant en outre une étape d'engagement en différenciation des cellules souches aviaires, adhérentes ou proliférant en suspension, consistant en l'addition dans le milieu asérique d'au moins un inducteur sélectionné parmi les inducteurs globaux acide rétinoïque et diméthylsulfoxyde (DMSO) ou spécifiques, notamment EGF, bFGF, NGF, TNF, IL6, SCF, IL11 et CNTF.
11. Utilisation de milieu de culture asérique, comprenant facultativement un ou plusieurs facteurs de croissance, pour la culture et la congélation de cellules aviaires, souches ou primaires, adhérentes ou non adhérentes.
12. Procédé de production de vaccins, de virus ou particules virales vivants ou atténués, de peptides ou de protéines recombinantes, de préférence à visée thérapeutique telles les anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de culture de cellules aviaires en milieu asérique selon la revendication 2.
13. Procédé selon la revendication 12 de production de virus ou de particules virales vivants ou atténués, ou l'un de leur dérivés recombinants, comprenant en outre les étapes :
- d'inoculer des dites cellules aviaires avec le dit virus ou particules virales avec un coefficient m.o.i.(multiplicity of infection) compris de préférence entre 0.01 et 0.5.et,
  - de cultiver les dites cellules en milieu asérique jusqu'à la lyse cellulaire et la libération de nouveaux virus ou de nouvelles particules virales dans le milieu de culture.
14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que le dit virus ou particule virale, ou un de leur dérivés recombinants, est sélectionné dans le groupe composé des adénovirus, des hépadnavirus, des herpesvirus, des orthomyxovirus, des papovavirus, des paramyxovirus, des picornavirus, des poxvirus, des réovirus et des rétrovirus.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le poxvirus est un avipoxvirus, de préférence sélectionné parmi le fowlpox virus, le juncopox virus, le mynahpox virus, le pigeonpox virus, le canarypox virus, le psittacinepox virus, le quailpox virus, le sparrowpox virus, le starlingpox virus et le turkeypox virus.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que le poxvirus est sélectionné parmi le virus de la vaccine et le virus de la variole (smallpox), natif ou recombinant.

17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que le virus de la vaccine est la souche Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) (ATCC No VR-1508).

18. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le virus est un orthomyxovirus, de préférence le virus de la grippe.

19. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le virus est un paramyxovirus, de préférence choisi parmi le virus de la rougeole, le virus des oreillons et le virus de la rubéole.

20. Peptide ou protéine recombinante obtenue par la mise en œuvre du procédé de production selon les revendications 12 à 19.

21. Vaccin anti-infectieux obtenu par la mise en œuvre du procédé de production selon les revendications 12 à 19 ou comprenant un peptide ou une protéine selon la revendication 20.

22. Culture cellulaire caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules aviaires, souches, primaires ou différenciées, adhérentes ou non adhérentes, et un milieu aséptique.



15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le poxvirus est un avipoxvirus, de préférence sélectionné parmi le fowlpox virus, le juncopox virus, le mynahpox virus, le pigeonpox virus, le canarypox virus, le psittacinepox virus, le  
5 quailpox virus, le sparrowpox virus, le starlingpox virus et le turkeypox virus.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que le poxvirus est sélectionné parmi le virus de la vaccine et le virus de la variole (smallpox), natif ou recombinant.

10

17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que le virus de la vaccine est la souche Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) (ATCC No VR-1508).

18. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le virus est un  
15 orthomyxovirus, de préférence le virus de la grippe.

19. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que le virus est un paramyxovirus, de préférence choisi parmi le virus de la rougeole, le virus des oreillons et le virus de la rubéole.

20

20. Peptide ou protéine recombinante obtenue par la mise en œuvre du procédé de production selon les revendications 12 à 19.

21. Vaccin anti-infectieux obtenu par la mise en œuvre du procédé de production  
25 selon les revendications 12 à 19 ou comprenant un peptide ou une protéine selon la revendication 20.

22. Culture cellulaire caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules aviaires, souches, primaires ou différenciées, adhérentes ou non adhérentes, et un milieu  
30 asérique.

23. Culture cellulaire non adhérente selon la revendication 22 présentant une densité cellulaire en milieu asérique supérieure ou égale à  $1.10^6$  cellules / ml.
24. Utilisation d'une culture cellulaire selon les revendications 22 et 23, pour la production en milieu asérique de vaccins, de virus et de peptides ou de protéines recombinantes, de préférence à visée thérapeutique telles les anticorps.

Milieu Témoin HAMF12 10% SVF

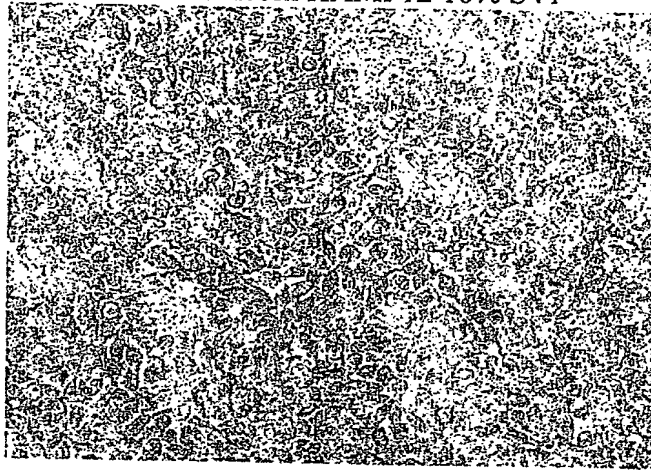


FIGURE 1A

VP-SFM, (In Vitrogen) 10% SVF

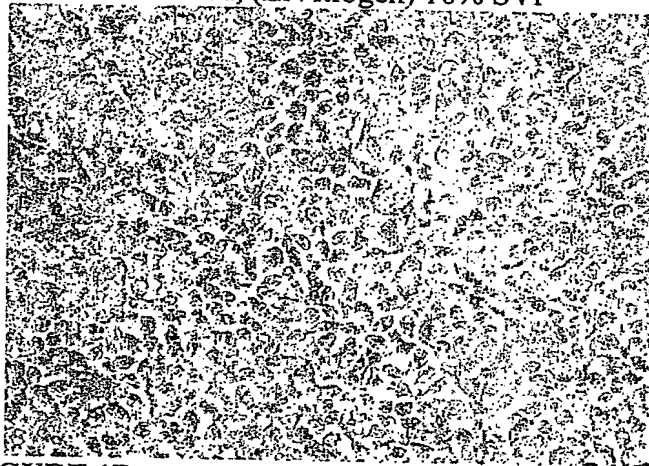


FIGURE 1B

EPISERF (In Vitrogen), 10% SVF

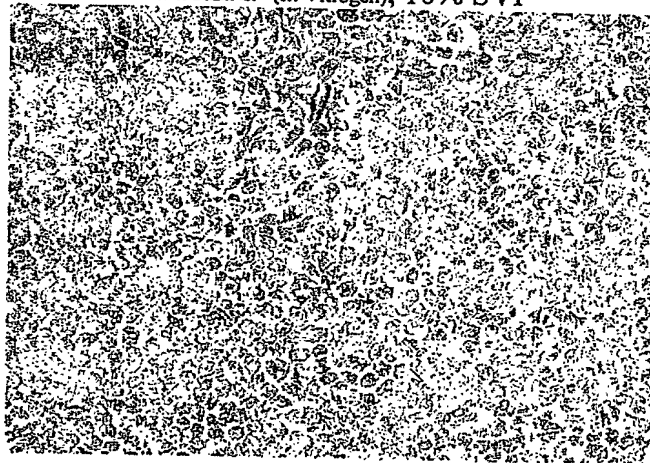


FIGURE 1C

OPTIPRO (InVitrogen) 10% SVF

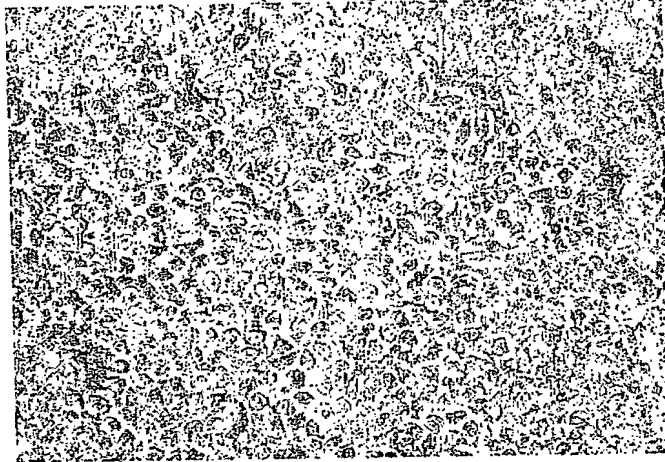


FIGURE 1D

Ex cell 325 PF CHO (JRH), 10% SVF

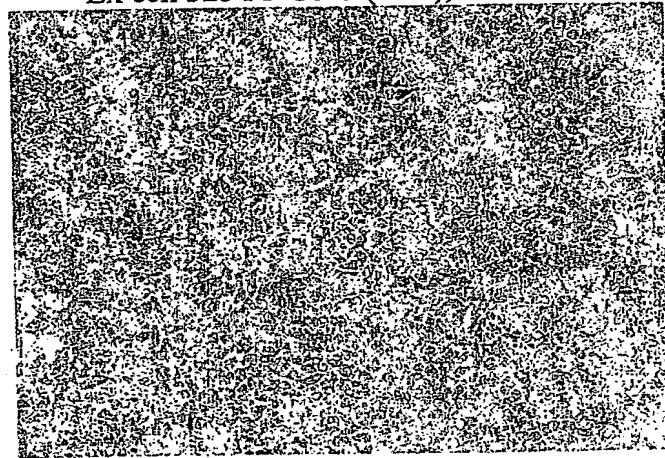
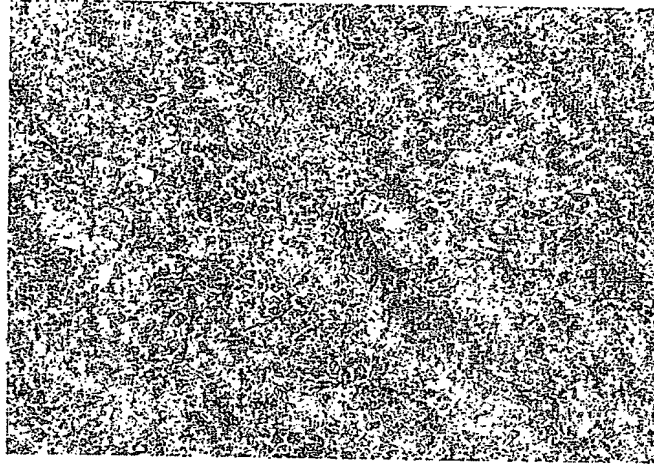


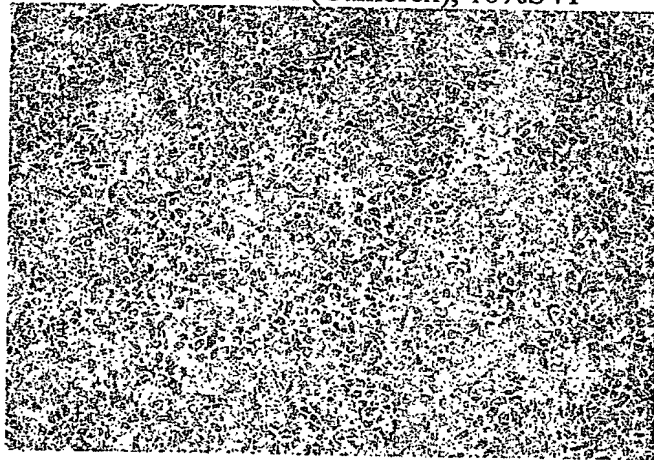
FIGURE 1E

Ex cell 302 serum free (JRH), 10% SVF



**FIGURE 1F**

Pro 293 S-CDM (Cambrex), 10%SVF



**FIGURE 1G**

Pro CHO5 CDM (Cambrex), 10%SVF

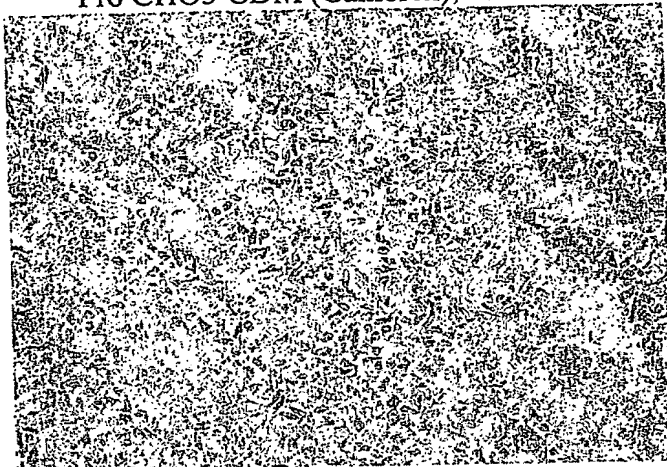


FIGURE 1H

LC17 (Cambrex), 10%SVF

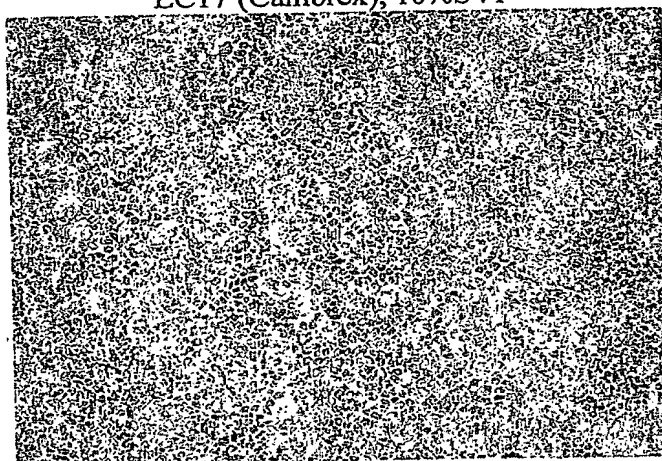
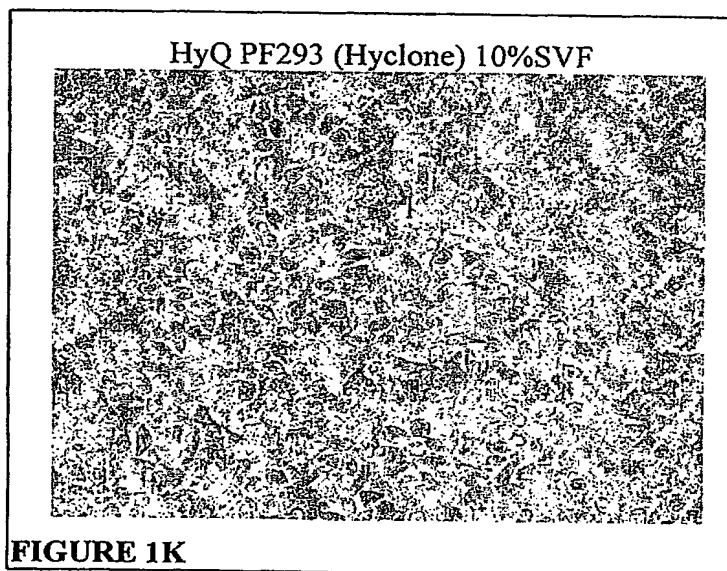
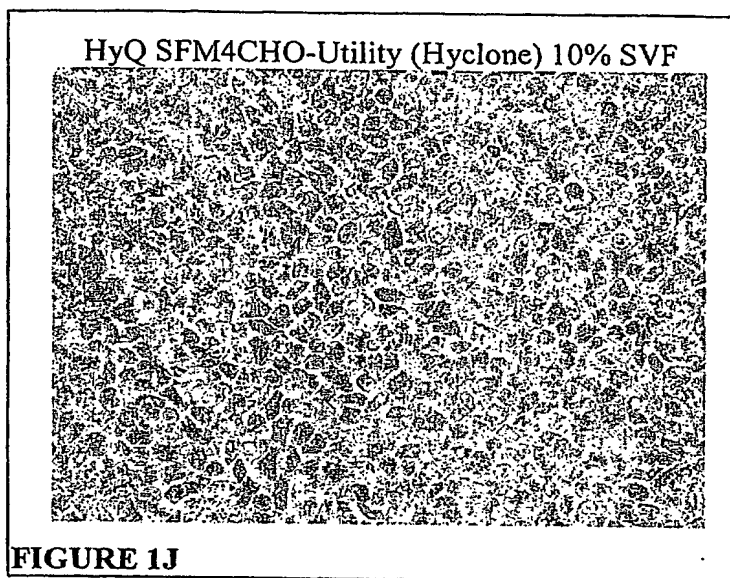
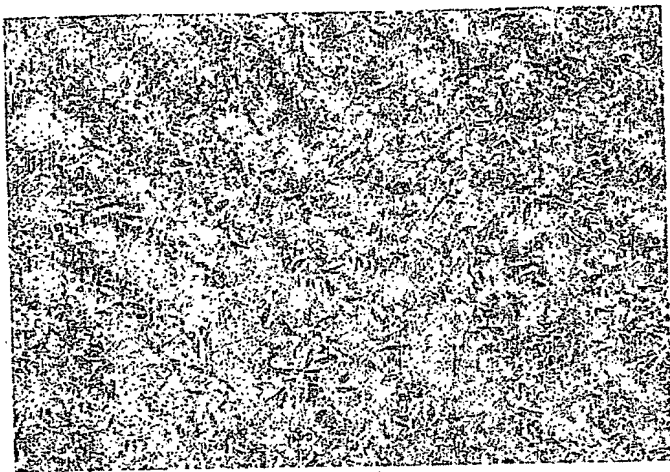


FIGURE 1I



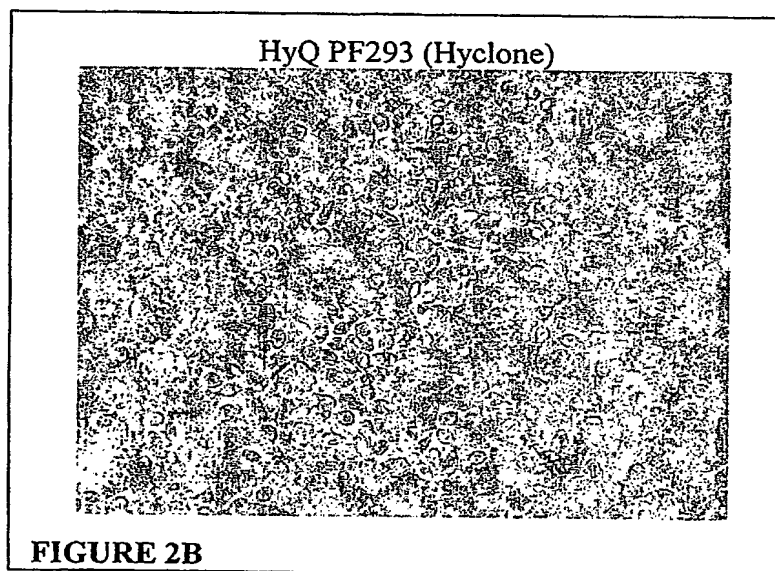
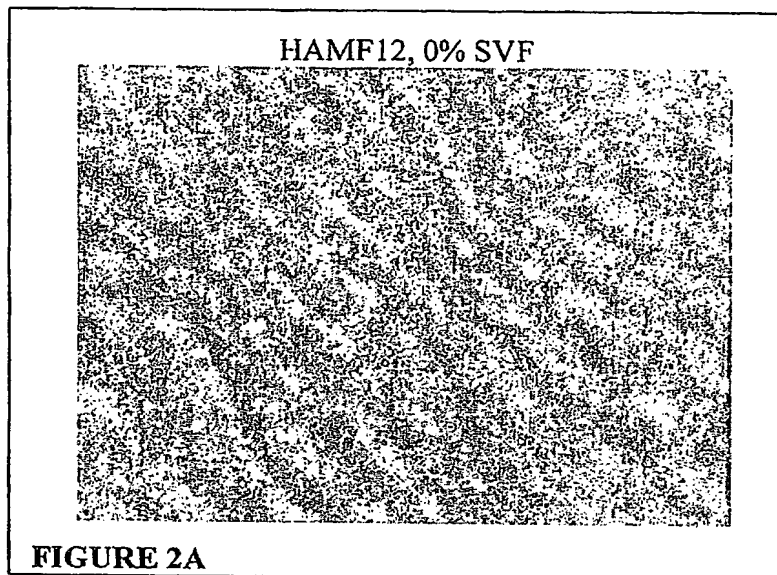
HyQ PF Vero (Hyclone) 10%SVF



**FIGURE 1L**



7 / 13



HyQ SFM4CHO-Utility (Hyclone)

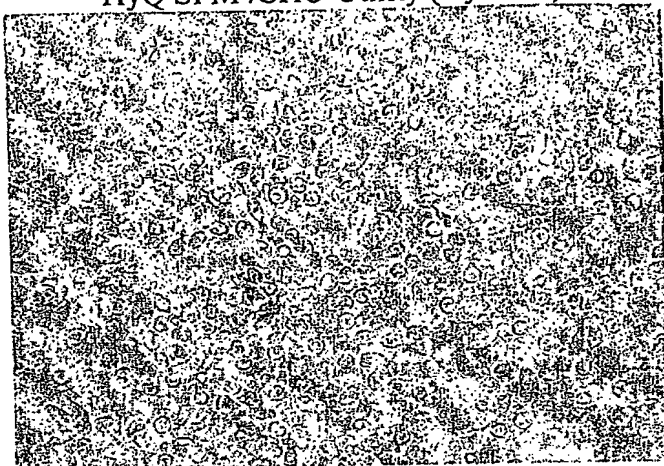


FIGURE 2C

EPISERF (In Vitrogen).

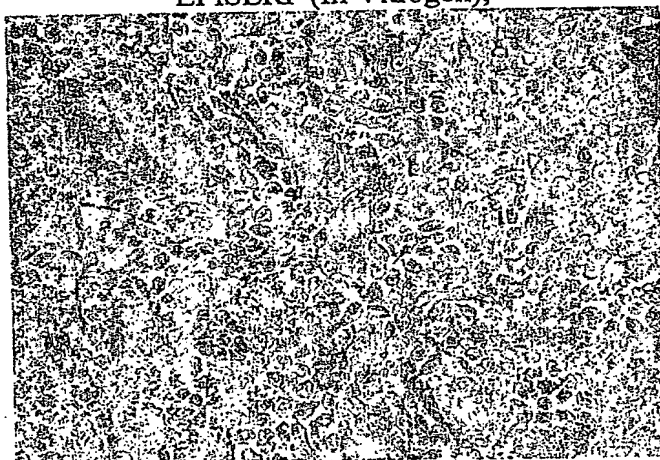


FIGURE 2D

9 / 13

Pro 293 CDM (Cambrex),

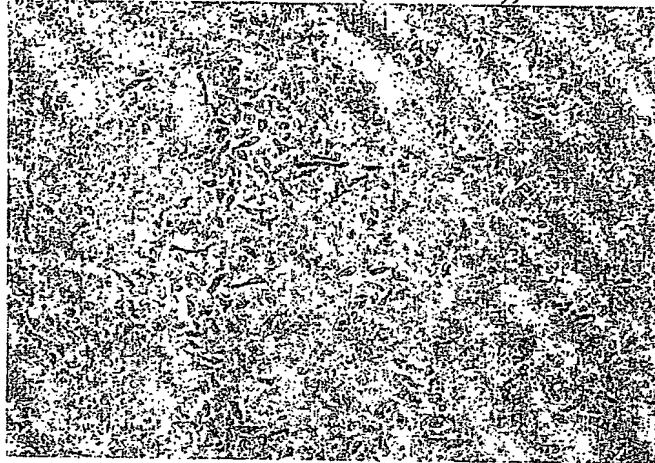


FIGURE 2E

LC17 (Cambrex),

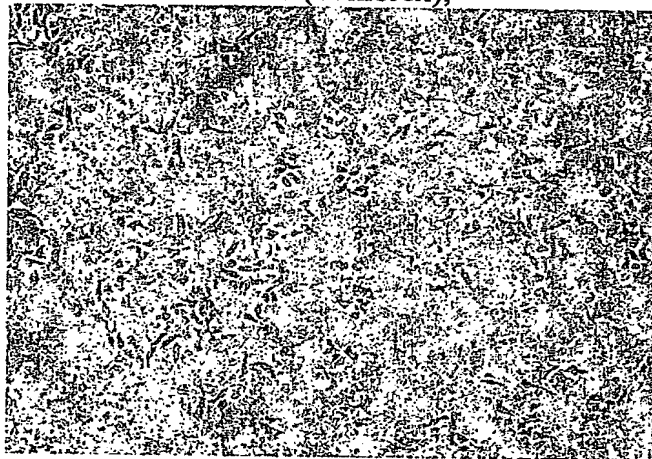
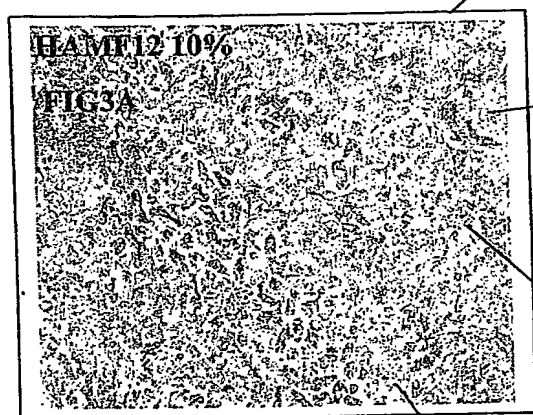
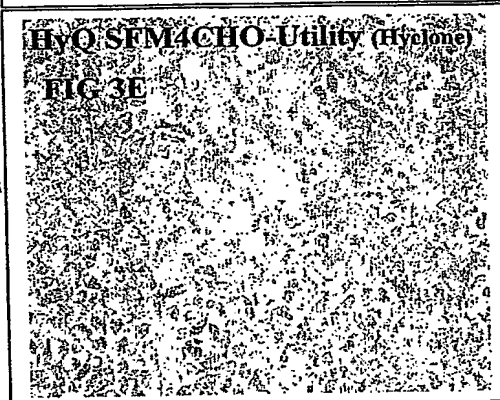
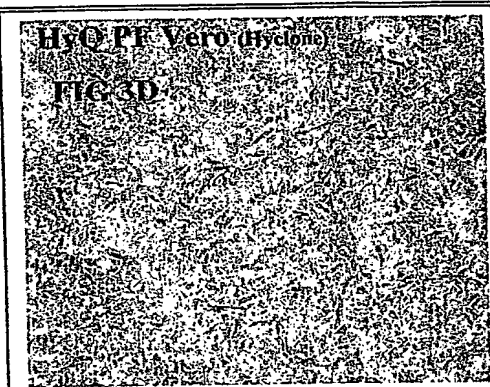
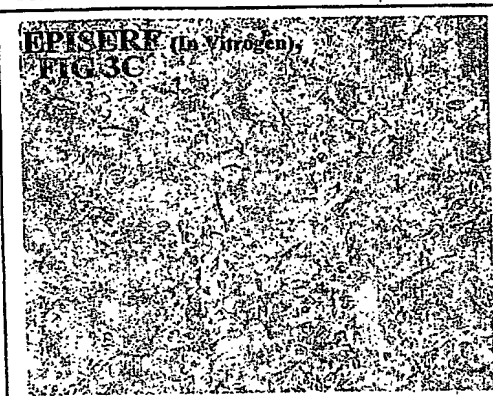
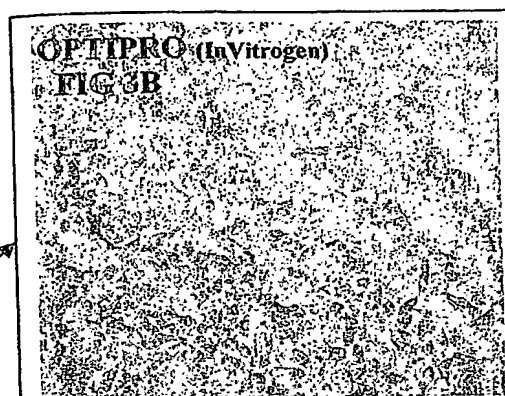


FIGURE 2F

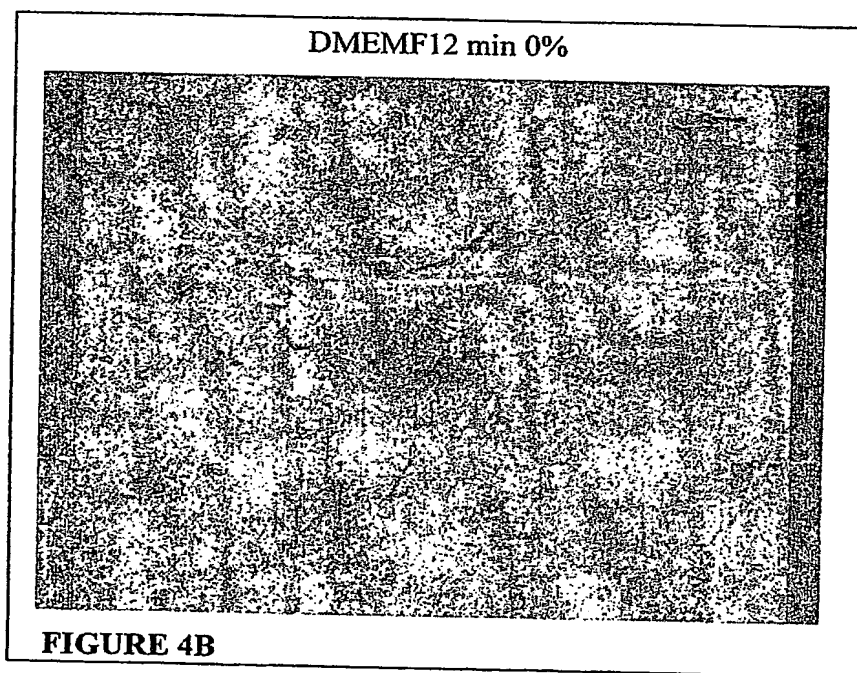
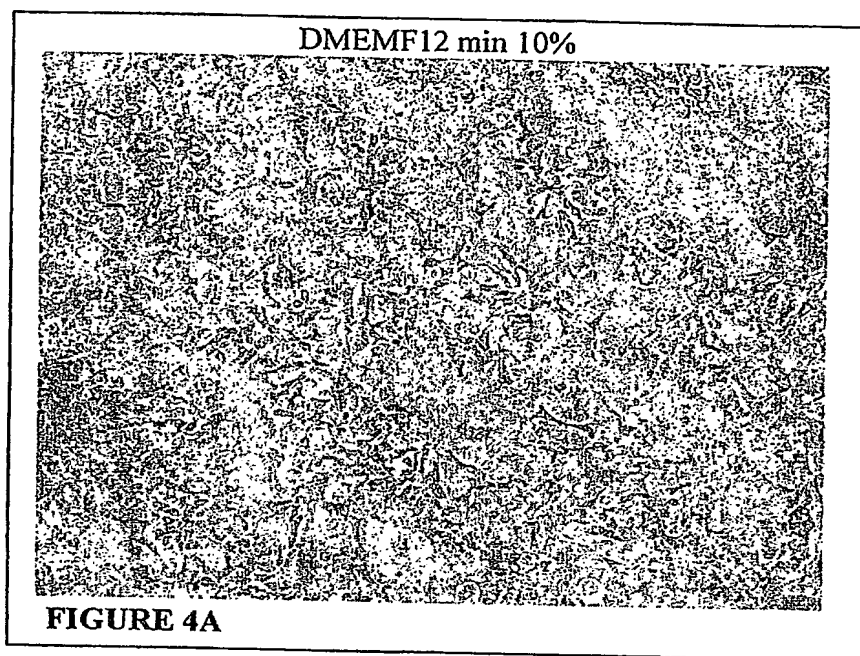


Morphologie de référence des  
cellules souches aviaires  
S86N45

DIFFERENCIATION



11 / 13



LC17 (Cambrex)

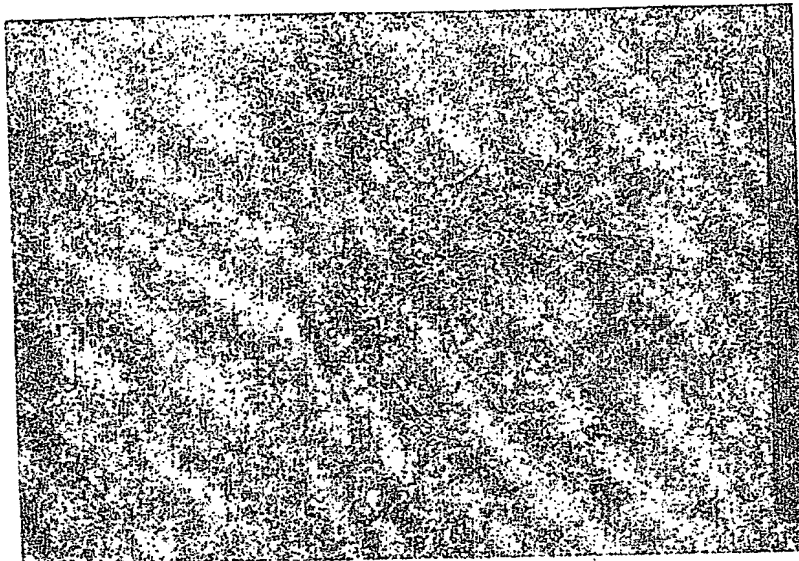


FIGURE 4C

EPISERF (In Vitrogen),

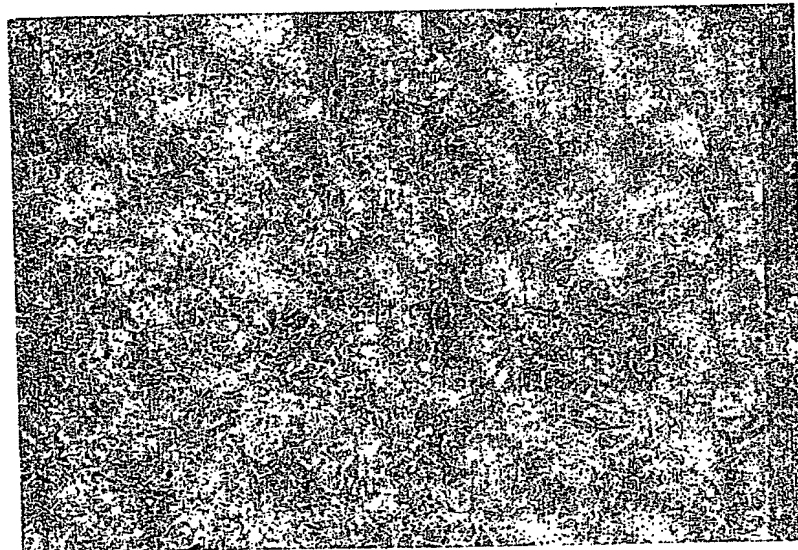
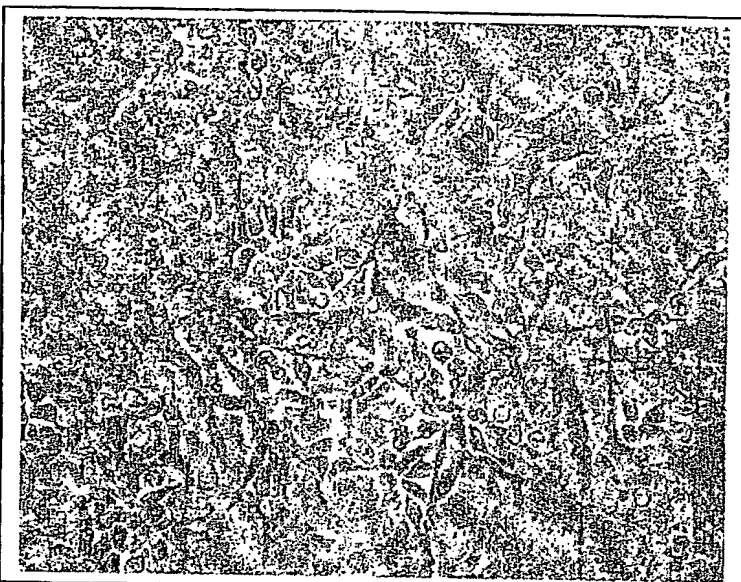


FIGURE 4D

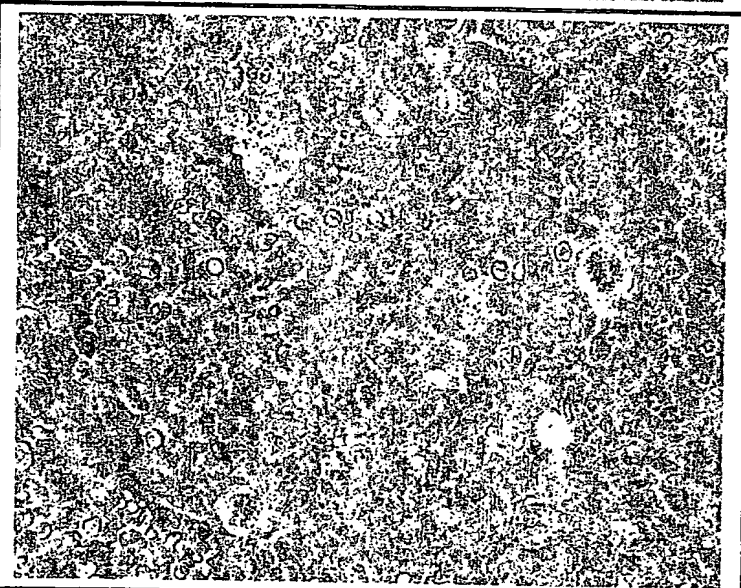
**FIGURE 5A**

DMEMF12 min 10%



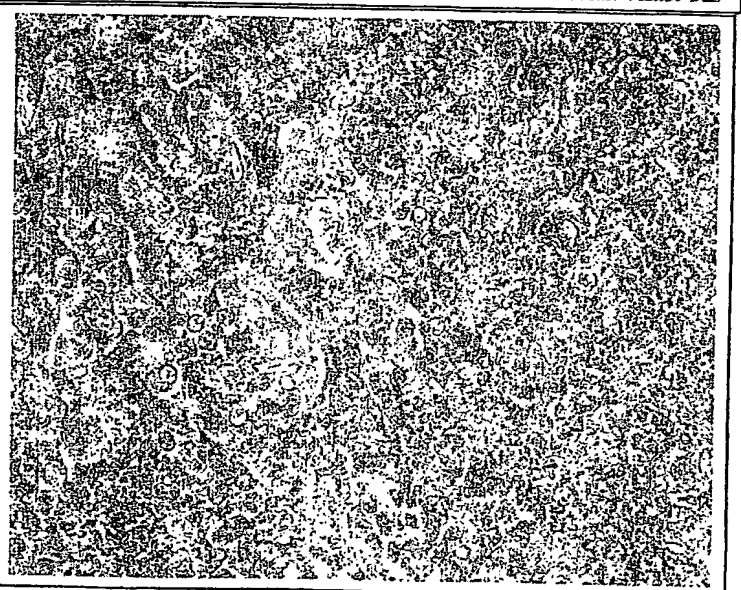
**FIGURE 5B**

Ex cell 293 (JRH)  
10%SVF



**FIGURE 5C**

LC17 (Cambrex)  
10%SVF





DÉPARTEMENT DES BREVETS

bis, rue de Saint Pétersbourg

300 Paris Cedex 08

téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1 / ...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W : 270601

<b>Autres références pour ce dossier (facultatif)</b>	241054 D21824 NT
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>	03.14.389

**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

CULTURE DE CELLULES AVIAIRES EN MILIEU ASERIQUE

**DEMANDEUR(S) :**

VIVALIS :

Lieudit la Corbière,

49450 ROUSSAY

FRANCE

**DESIGNÉ(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

<b>1</b>	Nom	GUEHENNEUX Fabienne	
	Prénoms		
Adresse	Rue	115, avenue de la Ferrière	
	Code postal et ville	44700 ORVAULT FRANCE	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>2</b>	Nom		
	Prénoms		
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ]	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>3</b>	Nom		
	Prénoms		
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	[ ] [ ] [ ] [ ] [ ]	
Société d'appartenance (facultatif)			

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**  
**DU (DES) DEMANDEUR(S)**  
**OU DU MANDATAIRE**  
(Nom et qualité du signataire)

09/12/2003

92-1142



**PCT/IB2004/002621**

